

Die Bestimmung der
Desoxyribonukleinsäure-Synthese-
dauer von Lymphdrüsenzellen bei
Patienten mit chronischer
lymphatischer Leukämie durch
Doppelmarkierung mit 3H -Thymidin
und 14C -Thymidin in vivo

Klaus Wittmann

1970

Aus der 1. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof.Dr.H.Schwiegk
und dem Institut für Hämatologie der Gesellschaft für
Strahlenforschung, Assoziation EURATOM, München
Vorstand: Prof.Dr.W.Stich

Die Bestimmung der Desoxyribonukleinsäure-Synthesedauer
von Lymphdrüsenzellen bei Patienten mit chronischer
lymphatischer Leukämie durch Doppelmarkierung mit
 ^3H -Thymidin und ^{14}C -Thymidin in vivo.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilian Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Wittmann

aus

Augsburg

im Jahre

1970

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Stich

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 13. Oktober 1970



Die Bestimmung der Desoxyribonukleinsäure-Synthesedauer von Lymphdrüsenzellen bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie durch Doppelmarkierung mit ^3H -Thymidin und ^{14}C -Thymidin in vivo.

EINLEITUNG	4
I. DAS TRITIUMMARKIERTE THYMIDIN IN DER AUTORADIOGRAPHIE	6
A) <u>Stoffwechsel und Wirkung von ^3H-Thymidin in der Zelle</u>	6
1) Einbau und Abbau des ^3H -Thymidin im Organismus	6
2) Die Stabilität der DNS	8
3) Wiederverwendung von DNS-Abbauprodukten	9
4) Wirkung des ^3H -Thymidins auf die Zelle	9
B) <u>Verschiedene Methoden zur Bestimmung der DNS-Synthesezeit mittels ^3H-Thymidin- Autoradiographie</u>	11
1) Die Markierte-Mitosen-Methode	11
2) Änderung des Markierungsindex nach ein- bzw. mehrmaliger Injektion von ^3H -Thymidin	14
3) Berechnung aus Markierungsindex und Generationszeit	15
4) Berechnung aus Markierungsindex, Mitose- index und Mitosedauer	16
5) Silberkornanalysen während Dauermarkierung	16
6) Die Doppelmarkierungsmethode	17
II. LYMPHKNOTEN UND LYMPHOZYT BEI CHRONISCHER LYMPHADENOSE	18
A) <u>Die chronische lymphatische Leukämie</u>	18
1) Krankheitsverlauf	19
2) Laborbefunde	20
B) <u>Der Lymphknoten</u>	21

1) Bau und Funktion des normalen Lymph-	21
knotens	
2) Der Lymphknoten bei chronischer Lympha-	22
denose	
C) Der Lymphozyt -	25
<u>Vergleich zwischen normalen Lymphozyten und</u>	
<u>lymphatischen Zellen bei chronischer</u>	
<u>Lymphadenose</u>	
1) Vorkommen und Morphologie	25
2) Die Lebensdauer der Lymphozyten	26
3) Rezirkulation der Lymphozyten	29
4) Funktion der Lymphozyten	29
III. MATERIAL UND METHODE UNSERER UNTERSUCHUNGEN	32
A) <u>Kasuistik</u>	32
B) <u>Methodik</u>	42
1) Lokale Markierung eines oberflächlichen	42
inguinalen Lymphknotens in vivo	
2) Anfertigung von Ausstrichen und Schnitten	43
3) Färbung der Präparate nach Feulgen	45
4) Beschichtung der Präparate mit flüssiger	47
Emulsion und Exposition	
5) Weitere fototechnische Behandlung der	48
Präparate	
IV. Theoretische Grundlagen zur Berechnung der DNS-	48
Synthesedauer nach der Doppelmarkierungsmethode	
V. AUSWERTUNG UND ERGEBNISSE	54
1) Kriterien zur Auswertung der Präparate	54
2) Ergebnisse der Auswertung	56

VI. DISKUSSION	57
A) <u>Lokale Anwendung der Doppelmarkierungsmethode in vivo bei leukämischen Lymphknotenzellen</u>	57
1) Voraussetzungen	57
2) Vorteile	57
B) <u>Der Einbau markierten Thymidins in Lymphknotenzellen bei chronischer Lymphadenose</u>	58
1) Markierungsindex	58
2) Morphologische Differenzierung der markierten Zellen	59
C) <u>Streuungsbreite der Ergebnisse</u>	60
1) Versuchsbedingungen	60
2) Stadium der Erkrankung	61
D) <u>Vergleich unserer Ergebnisse mit Befunden anderer Autoren</u>	61
1) Vergleichbarkeit von in vivo und in vitro gewonnenen Ergebnissen	61
2) Leukämien des Menschen (in vivo)	64
3) Andere Malignome (in vivo)	66
4) Vergleich zwischen normalen und malignen Zellen des Menschen	66
VII. ZUSAMMENFASSUNG	68
LITERATURVERZEICHNIS	70

Einleitung

Eine wichtige Aufgabe der biologischen Forschung ist die Aufklärung der Proliferationsvorgänge in Zellen menschlicher und tierischer Gewebe. Dabei geht es nicht nur um die Kenntnis der Wachstumsmechanismen in gesunden Geweben, sondern ebenso sehr um die Erweiterung des Wissens über das Tumorwachstum. Es ist heute immer noch sehr wenig über das Wesen der meisten neoplastischen Erkrankungen bekannt. Die Klärung der Frage, wie es dazu kommen kann, daß ein uns völlig normal erscheinendes Gewebe plötzlich maligne entartet, würde das Verständnis der Krebskrankheiten sehr verbessern. Dies käme nicht zuletzt der Therapie zugute ⁵¹.

Im Lauf der letzten Jahre wurden verschiedene Methoden zum Studium der Zellproliferation entwickelt. WILBER ⁸¹, QUASTLER ⁶⁴ und KILLMANN ³⁴ geben hierüber ausführlich Auskunft. Einige Methoden, die ausschließlich auf der Beobachtung der zu untersuchenden Zellpopulation beruhen, sind nur in Spezialfällen anwendbar. So ist die Messung der Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Mitosen als Maß für die Proliferationsrate nur dann sinnvoll, wenn die untersuchte Population eine nahezu synchrone Zellentwicklung aufweist. Die Zeit, die für die Verdopplung einer Population notwendig ist, kann man nur dann mit der Generationszeit der einzelnen Zellen gleichsetzen, wenn sich alle Zellen teilen.

Die meisten anderen Untersuchungsmethoden erfordern einen Eingriff in den Zellstoffwechsel. So läßt sich nach Gabe von Colchicin, das bekanntlich alle Zellen in der Metaphase blockiert, aus dem Mitoseindex und dem zeitlichen Anwachsen der Zellen in

der Metaphase ein Maximalwert für die Generationszeit bestimmen. Auch für diese Berechnung wird vorausgesetzt, daß sich alle Zellen der Population teilen. Schließlich kann man Zellen mit ionisierenden Strahlen oder radiomimetischen Chemikalien behandeln und aus dem proportional der Zeit zu beobachtenden Abnehmen der aufgetretenen Chromosomenanomalien die Dauer des Zellzyklus ermitteln. Über die Verwendung von Strahlen zur Untersuchung des Zellwachstums berichtet LAJTHA ³⁸.

Einen großen Aufschwung brachte die Einführung der Autoradiographie in der Erforschung der Zellkinetik. Die Grundlagen der Autoradiographie werden von FICQ ¹⁹, RUTHMANN ⁶⁸ und SCHULTZE ⁷¹ genau geschildert. Eine der ersten radioaktiven Substanzen, die zur Markierung verwendet wurde, war der radioaktive Phosphor ³²P. Auch HOWARD u. PELC ²⁹ arbeiteten mit ³²P, sie teilten den Zellzyklus in vier Phasen ein, die auch heute noch gebräuchlich sind. Der Generationszyklus (C) beginnt bei der Mitose (M), er reicht über die postmitotisch-präsynthetische Phase (G1) zur DNS-Synthesephase (S) und endet mit der postsynthetisch-prämitotischen Phase (G2). Die Anwendung des radioaktiven Phosphors ist begrenzt, da die Zahl der im Gewebe vorhandenen phosphorhaltigen Verbindungen groß ist, und dieser Markierungsstoff deshalb in sehr verschiedene Substanzen eingebaut wird.

Heute werden in der Autoradiographie vor allem Stoffe verwendet, die spezifisch in Nukleinsäuren eingebaut werden, wie Adenin, Cytidin, Uridin, Desoxycytidin und Thymidin, die zuvor mit ¹⁴C oder ³H markiert wurden.

I. Das Tritiummarkierte Thymidin in der Autoradiographie

Die Einführung des tritiummarkierten Thymidins in die Autoradiographie führte zu einem bedeutenden Fortschritt in der Untersuchung aller Fragen der Zellproliferation. Durch ^3H -Thymidin wird die DNS spezifisch markiert. Der Einbau in andere Verbindungen erfolgt nur in so geringem Umfang, daß er vernachlässigt werden kann. Tritium wird deshalb am häufigsten von allen biologisch interessanten Isotopen zur Autoradiographie verwendet, weil es das beste autoradiographische Auflösungsvermögen hat. Grund dafür ist die sehr niedrige mittlere Energie der β -Teilchen dieses Isotops (5,7 kv), entsprechend einer mittleren Reichweite von nur $1/\mu$ in Materie mit der Dichte 1. Die geringe Reichweite hat jedoch den Nachteil, daß bei Autoradiogrammen bereits im Material des ^3H -markierten Schnittes eine je nach Schichtdicke mehr oder weniger große β -Selbstabsorption stattfindet ^{50, 71}, wodurch die quantitative Auswertung der Präparate erschwert wird.

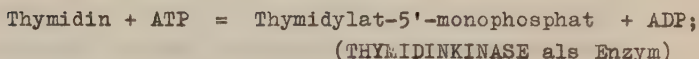
A) Stoffwechsel und Wirkung von ^3H -Thymidin in der Zelle

1) Einbau und Abbau des ^3H -Thymidins im Organismus

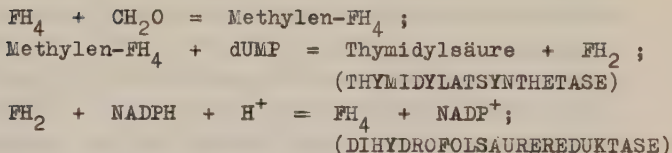
In den meisten Säugetierzellen ist das Thymidin kein natürlicher DNS-Vorläufer. Vielmehr wird in der Zelle durch Phosphorylierung von Desoxyuridin und anschließende Methylierung das Thymidylat-5'-monophosphat, die Thymidylsäure gebildet, die dann als Baustein der DNS verwendet wird. Die Fermente zum Einbau des exogenen Thymidins sind in den Zellen jedoch vorhanden, wenn auch nicht in allen Zellsystemen in gleicher Höhe

und Aktivität. Die folgende Skizze (nach WILMANN⁸⁰) zeigt die beiden in der Zelle möglichen Wege zur Herstellung der Thymidylsäure:

a) Die Verwendung des exogenen Thymidins



b) Die endogene Synthese der Thymidylsäure



Dabei ist:

Thymidylat-5'-monophosphat = Thymidylsäure
 ATP = Adenosintri-phosphat
 ADP = Adenosindiphosphat
 FH₄ = Tetrahydrofolsäure
 dUMP = Desoxyuridyl-5'-monophosphat
 FH₂ = Dihydrofolsäure
 NADP⁺ = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat.

Mit der versuchsmäßig bestimmten Thymidineinbaurrate erfaßt man nur den Synthesevorgang, bei dem exogenes Thymidin verwendet wird. Der prozentuale Anteil des exogenen Thymidins an der gesamten Thymidylatsynthese beträgt nach übereinstimmenden Aussagen⁷¹ etwa 1%.

Das injizierte Thymidin wird etwa zur Hälfte innerhalb von 60 Minuten zu tritiiertem Wasser (THO)

abgebaut, während die andere Hälfte in die DNS eingebaut oder in andere Stoffwechselprodukte umgebaut wird. Die Zeit, die vom Beginn der Diffusion des Markierungsstoffes an für den Einbau zur Verfügung steht, die effektive Verfügbarkeitszeit, beträgt zwischen 40 und 60 Minuten. Insgesamt werden etwa 10 bis 20 % des injizierten Tritiumthymidins zur DNS-Markierung verwendet, der größte Teil des Einbaus vollzieht sich in den ersten 10 bis 15 Minuten ¹³.

Der Abbau des nicht eingebauten Tritiumthymidins erfolgt vor allem in der Leber. Mit Hilfe der Thymidinphosphorylase wird das Thymidin zu Thymin und weiter zu Dihydrothymin katabolisiert ⁵⁴. Diese beiden Stoffe werden im allgemeinen nicht zur DNS-Synthese verwendet, sie sind deshalb als Markierungsstoffe ungeeignet. Die Endprodukte des Abbaus im Organismus, das tritiierte Wasser (THO), die 'nicht flüchtige Tritiumaktivität' (NVTA) und die β -Aminoisobuttersäure (β H-BAIBA) werden zum größten Teil im Urin ausgeschieden.

2) Die Stabilität der DNS

Der Einbau des β H-Thymidin erfolgt nur in die DNS der Zellen, vor allem der Kerne, und zwar ausschließlich während der DNS-Synthesephase. Allgemein wird angenommen, daß die DNS, als das genetische Material, keinem Stoffwechsel unterliegt. Der Tritiumgehalt der markierten Zelle, meßbar durch die Silberkorndichte, bleibt deshalb solange konstant, bis sich die Zelle teilt. Zellen, die DNS synthetisieren, bereiten sich dadurch gewöhnlich auf eine Teilung vor. Neuerdings werden jedoch Anzeichen dafür gefunden, daß doch eine DNS-Synthese existieren könnte, die nicht

mit der Zellteilung in Zusammenhang steht, und daß die DNS einem langsamen Stoffwechsel unterliegt (siehe SCHULTZE ⁷¹). Das Ausmaß einer eventuellen metabolischen Aktivität der DNS wird jedoch so gering eingeschätzt, daß man vorläufig diese Möglichkeit vernachlässigen kann.

3) Wiederverwendung von DNS-Abbauprodukten

Eine Reutilisation von DNS-Stoffwechselprodukten ist immer wieder beschrieben worden. Dabei ging es unter anderem um die Frage, ob durch eine mögliche Wiederverwendung in größerem Ausmaße die Auswertung von Untersuchungsergebnissen beeinträchtigt werden könnte. Heute weiß man, daß eine Reutilisation in nicht sehr bedeutendem Grade stattfindet. Es konnte aber noch nicht geklärt werden, ob sie auf der Basis nieder- oder hochmolekularer Bruchstücke der DNS vor sich geht. Während ROBINSON ⁶⁶ sich für eine Reutilisation von niedermolekularen Bruchstücken auf Nukleosidebene, eventuell in Form des beim DNS-Abbau freigesetzten ³H-Thymidins aussprach, interpretierte HAMILTON ²⁵ seine Untersuchungsergebnisse unter anderem in Richtung auf eine mögliche Wiederverwendung größerer Bruchstücke. Insgesamt kann man sagen, daß eine Wiederverwendung katabolisierter DNS auf niedermolekularer Basis stattfindet. Die Versuche schließen allerdings nicht aus, daß zusätzlich auch größere Bruchstücke reutilisiert werden ⁷¹.

4) Wirkung des ³H-Thymidins auf die Zelle

RUBINI ⁶⁷ konnte nach Markierungsversuchen am Menschen bei ³H-Thymidindosen bis zu 0,31 μ C/g Gewicht und CRONKITE ¹² sogar bei Dosen bis zu 0,4 μ C/g Gewicht

keine zellschädigende Wirkung feststellen. Höhere Einzeldosen dagegen oder in kurzen Abständen wiederholt verabreichte kleine Dosen können schädlich auf die Zellen wirken und sie sogar vernichten. GREENBERG²² injizierte zwei Patienten mit akuter Leukämie zehnmal je 0,25 $\mu\text{C/g}$ Gewicht innerhalb von fünf Tagen. Nach knapp zwei Wochen fielen die Leukozyten von jeweils 50000 auf 2000 bzw. 900 pro cmm ab. Allerdings stiegen die Werte bei beiden Patienten nach wenigen Tagen wieder auf die alte Höhe an, eine Wiederholung des Markierungsschemas zeigte keine ähnliche Wirkung mehr.

Als klassische Kennzeichen von Strahlenschäden an Zellen gelten Pyknose, Atrophie, Mitosestop und Aberrationen. Bei Dosen bis 1 $\mu\text{C/g}$ Gewicht konnten bei Maus, Ratte, Meerschweinchen und Hund keine dieser Schäden festgestellt werden. Die Tatsache, daß auch bei Dosen bis 2 $\mu\text{C/g}$ Gewicht bei Tieren keine derartigen Wirkungen gefunden wurden, spricht eher dafür, daß die verwendeten Suchmethoden zu ungenau waren¹².

Die normalerweise verwendete Aktivität ergibt eine völlig unbedeutende Ganzkörperdosis. An den radiosensitivsten Stellen der Zellen, den Chromosomen, an denen ja die gesamte Aktivität konzentriert wird, können sich auch noch nach längerer Zeit Wirkungen zeigen¹³. Die akuten Wirkungen, auch größerer Dosen sind minimal, die Mißbildungen treten für gewöhnlich erst später auf. Außerdem wird unter dem Einfluß der Strahlen die Lebensdauer der Zellen reduziert. Die Gefahren des ^3H -Thymidins als potentieller karzinogener Faktor und Ursache genetischer Störungen wurden bis jetzt nicht genügend berücksichtigt.

Der spezifische Einbau des ^3H -Thymidins in die DNS, die kurze Reichweite des β -Strahlers Tritium mit dem optimalen Auflösungsvermögen, der rasche Abbau und die schnelle Ausscheidung der nicht eingebauten Markierungssubstanz, die weitgehende Stabilität der Markierung, die nur sehr geringe Beeinflussung der Ergebnisse durch eine mäßige Reutilisation von katabolisierten DNS-Bruchstücken und die relative Unschädlichkeit der verwendeten Aktivitäten machen das tritiierte Thymidin zu einem wertvollen Instrument der Autoradiographie, mit dessen Hilfe große Fortschritte in der Aufklärung des Zellwachstums erzielt wurden und noch zu erwarten sind.

B) Verschiedene Methoden zur Bestimmung der DNS-Synthesezeit mittels ^3H -Thymidin-Autoradiographie

Die Phase, in der zur Vorbereitung der Mitose die Desoxyribonukleinsäure redupliziert wird, nennt man die DNS-Synthesephase. Es gibt eine Reihe von Methoden, um die Dauer dieser Phase zu bestimmen. Teilweise sind sie auch dazu geeignet, die Dauer des Generationszyklus oder anderer Teilphasen zu ermitteln^{81, 34}. Sie beruhen alle darauf, daß markiertes Thymidin selektiv in die DNS eingebaut wird, und zwar ausschließlich während der DNS-Synthesephase. Dieser Einbau kann autoradiographisch nachgewiesen werden. Im folgenden sollen die wichtigsten dieser Methoden kurz geschildert werden.

1) Die Markierte-Mitosen-Methode

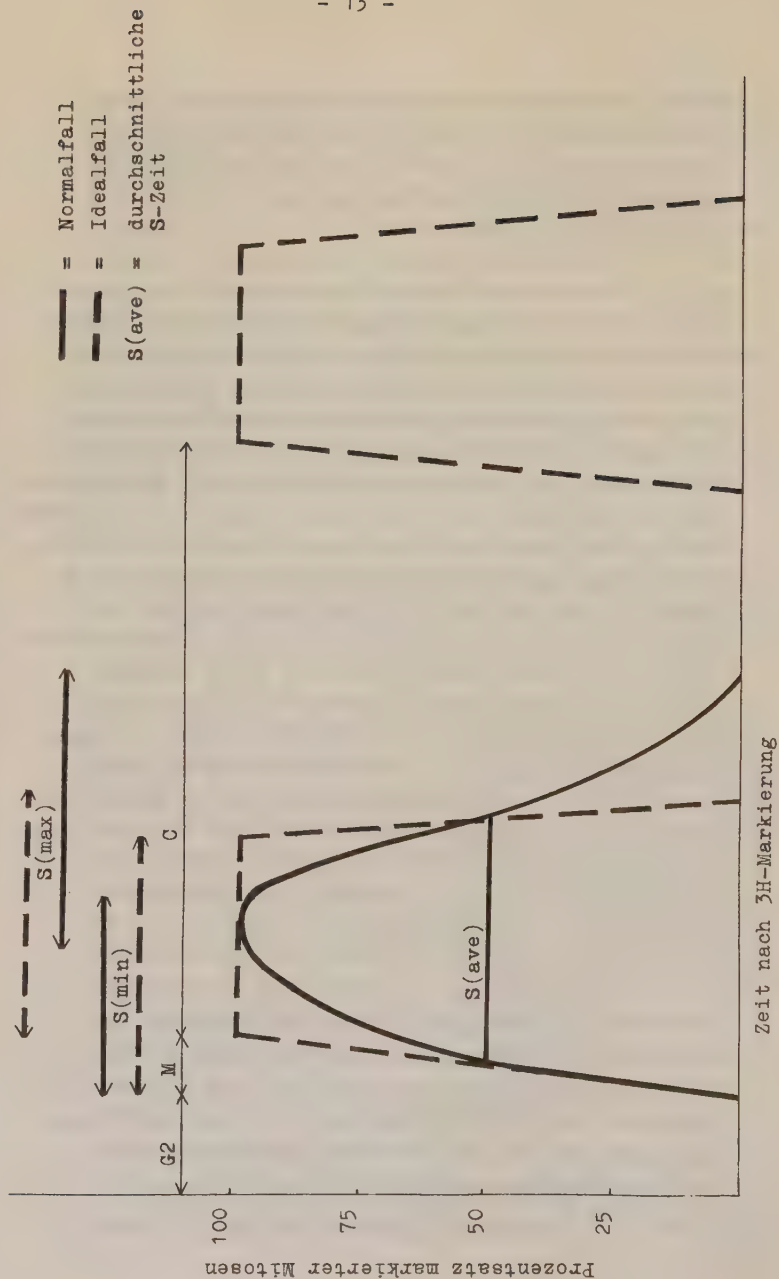
Am häufigsten wird die Markierte-Mitosen-Methode, die von QUASTLER und SHERMAN⁶⁵ entwickelt

wurde, verwendet. Unter anderem wurden damit eine Vielzahl normaler und maligner tierischer Zellsysteme untersucht 2, 16, 17, 35, 36, 52, 53, 56, 72, 73, 76, 79, wie auch einige Zellsysteme des Menschen 9, 10, 11, 30, 59, 69, 74, 75.

Dabei wird die DNS Synthesedauer aus dem zeitlichen Verlauf des Auftretens markierter Mitosen nach einmaliger Injektion von ^3H -Thymidin bestimmt. Von dem zu untersuchenden Gewebe müssen zu verschiedenen Zeiten nach Injektion des Markierungstoffes Proben entnommen werden. Wenn die postsynthetische-prämitotische Phase G2 bzw. die DNS-Synthesephase aller Zellen der untersuchten Population gleich lang sind, verlaufen Anstieg und Abfall des Prozentsatzes markierter Mitosen steil, und die Kurve liegt lange Zeit auf dem 100 % Niveau. In diesem Fall gibt die Zeit zwischen dem Auftreten der ersten markierten und dem Wiederauftreten der ersten unmarkierten Mitose die Dauer der DNS-Synthesephase an. Schwankt jedoch die Länge der G2-Phase, so sind Anstieg und Abfall der Kurve flacher. Eine Schwankung in der DNS-Synthesedauer ergibt einen besonders flachen Abfall der Kurve. Da die genannten Phasen in den meisten Geweben nicht ganz konstant sind, wird zur Bestimmung der mittleren DNS-Synthesedauer meistens die Zeitspanne zwischen den 50 %-Werten im Kurvenanstieg und Kurvenabfall verwendet.

Skizze 1 zeigt die Zeit nach der ^3H -Thymidin-Markierung aufgetragen gegen den ansteigenden und wieder abfallenden Prozentsatz markierter Mitosen im Anschluß an diese Markierung. Es wird zunächst ein Idealfall mit gleichmäßigem schnellem Anstieg, langem Verweilen auf dem 100 % Plateau und raschem Abfall des Prozentsatzes markierter Mitosen angenommen.

Skizze I: Ermittlung der DNS-Synthesedauer nach der Markierten-Mitosen-Methode (nähere Erläuterungen siehe Text)



Die drei eingezeichneten möglichen Werte für die Dauer der DNS-Synthesephase, einmal gerechnet vom Auftreten der ersten markierten bis zum Wiederauftreten der ersten unmarkierten Mitose, zum zweiten vom Zeitpunkt, an dem alle Mitosen erstmals markiert sind, bis zu jenem, an dem wieder alle Mitosen unmarkiert sind, und schließlich zum dritten als Zeitspanne zwischen den beiden 50%-Werten der Kurve, sind in diesem Idealfall gleich lang. Im Normalfall jedoch, der in dieselbe Skizze eingezeichnet ist, würden sich in der gleichen Reihenfolge ein Minimalwert, ein Maximalwert und ein Durchschnittswert ergeben. Der Durchschnittswert der beiden Fälle deckt sich, er spiegelt die normalerweise bestehenden Verhältnisse am besten wieder.

2) Änderung des Markierungsindex nach ein- bzw. mehrmaliger Injektion von ^3H -Thymidin

Über diese Möglichkeit einer annähernden Bestimmung der DNS-Synthesezeit berichtet KILLMANN ³⁴, wobei er sich auf Untersuchungen von MAUER ⁴⁹ stützt. Markiert man eine Zellpopulation durch einmalige Injektion von ^3H -Thymidin, wird der Markierungsindex ansteigen, wenn sich die Population teilt, sofern dies in einem geschlossenen System geschieht. Die Zeit von der Injektion an gerechnet bis zum Auftreten eines ersten Markierungsgipfels entspricht dabei in etwa der Summe von S + G₂ + M. Da die beiden letzteren Abschnitte im Vergleich zu S sehr kurz sind, kann man aus dieser Zahl einen ungefähren Schätzwert von S angeben.

Wenn die ^3H -Thymidinmarkierung mehrmals in gleichem Abstand erfolgt, zeigt der jeweilige Markierungsanstieg die Fraktion der proliferierenden Zellen

an, die seit der jeweils vorhergehenden Injektion in die DNS-Synthesephase eingetreten sind. Aus der Zeit zwischen den Injektionen und der Zunahme der Markierung läßt sich der Markierungsanstieg pro Zeiteinheit berechnen. Aus dem Quotienten zwischen ursprünglichem Markierungsindex und dem Markierungsanstieg pro Zeiteinheit kann man auf die DNS-Synthesedauer schließen. Folgende Bedingungen müssen bei dieser Methode erfüllt sein: Es muß ein Steady State herrschen, die Zeit zwischen den einzelnen Injektionen muß kleiner als S sein, und die zweite Injektion muß zu einem Zeitpunkt geschehen, an dem die proliferierenden Zellen, die bei der ersten Injektion nicht in der S-Phase waren, noch nicht alle in diese eingetreten sind.

3) Berechnung aus Markierungsindex und Generations-Zeit

Diese Berechnung wandte KILLMANN³² an. Er ermittelte zunächst die Generationszeit aus Silberkornanalysen nach einmaliger Injektion von ³H-Thymidin und den Markierungsindex. Dann berechnete er die DNS-Synthesedauer nach folgender Formel:

$$S\text{-Zeit} = \text{Generationszeit} \times \text{Markierungsindex}$$

Der Markierungsindex ergibt sich als Quotient aus den markierten Zellen einer Population und der Gesamtzellzahl derselben Population. Um für den Markierungsindex einen exakten Wert zu erhalten, muß man entweder mit einer Zellpopulation arbeiten, in der alle Zellen proliferieren, oder man muß innerhalb der Population die Größe der proliferierenden Fraktion (Growth Fraction) kennen. Verwendet man die Formel ohne Berücksichtigung dieser Bedingung, erhält man einen unteren Grenzwert für die DNS-Syntheszeit.

4) Berechnung aus Markierungsindex, Mitoseindex und Mitosedauer

Es gelten dieselben Erwägungen wie für die vorhergehende Berechnungsart. Für die drei angeführten Parameter lassen sich folgende Gleichungen aufstellen ⁷²:

$$a) \text{ Markierungsindex} = \frac{\text{S-Zeit}}{\text{Generationszeit}} ;$$

$$b) \text{ Mitoseindex} = \frac{\text{Mitosedauer}}{\text{Generationszeit}} ;$$

Wenn die Zellteilung eines Gewebes nur auf Teilung beruht, sind die beiden Nenner gleichzusetzen. Die sich ergebende Gleichung lautet dann:

$$c) \frac{\text{Markierungsindex}}{\text{Mitoseindex}} = \frac{\text{S-Zeit}}{\text{Mitosedauer}} ;$$

und daraus:

$$d) \text{ S-Zeit} = \frac{\text{Markierungsindex} \times \text{Mitosedauer}}{\text{Mitoseindex}} ;$$

wobei der Mitoseindex sich als Quotient aus der Zahl der Mitosen einer Population und der Gesamtzellzahl der Population ergibt.

5) Silberkornanalysen während Dauermarkierung

Es besteht auch die Möglichkeit, während einer länger dauernden Markierung mit ³H-Thymidin fortlaufend die Silberkornzahlen der markierten Zellen zu beobachten und aus ihrem Anstieg auf die DNS-Synthesedauer zu schließen ⁴⁷.

6) Die Doppelmarkierungsmethode

Die im weiteren Verlauf dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden nach der Doppelmarkierungsmethode durchgeführt, die zuerst von HILSCHER u. MAURER ²⁷, PILGRIM u. MAURER ⁶² und WIMBER u. QUASTLER ⁸² beschrieben wurde. Diese Methode ist für Untersuchungen am Menschen gut geeignet, da sie, z.B. im Gegensatz zur Markierten-Mitosen-Methode, nur eine einmalige Probeentnahme aus dem zu untersuchenden Organ erfordert. Die Markierung erfolgt in zwei Etappen. Dabei wird zuerst ³H-Thymidin (Maximalenergie 0,018 MeV, mittlere Energie 0,0057 MeV, mittlere Reichweite in Emulsion 1 - 2/ μ) und nach einem bestimmten zeitlichen Abstand ¹⁴C-Thymidin (Maximalenergie 0,155 MeV, mittlere Energie 0,049 MeV, mittlere Reichweite in Emulsion 50 - 60/ μ) in den zu untersuchenden Organismus injiziert. Neben den bereits erwähnten Autoren arbeiteten mit dieser Methode, deren Grundlagen noch ausführlich beschrieben werden, LENNARTZ ⁴², OHKITA ⁵⁶, PILGRIM ⁶³ sowie WEGENER ⁷⁹, die sich alle mit tierischen Zellsystemen befaßten. Am Menschen wurden mit leicht abgewandelten Methoden vor allem Granulozyten- und Erythrozytenvorläufer untersucht ^{31, 39}. Während LALA ³⁹ die ³H-Thymidin-Markierung in vivo, die ¹⁴C-Markierung dagegen in vitro vornahm, führte KESSE-ELIAS ³¹ seine Untersuchungen an Erythrozytenvorläufern bei hamatologisch Gesunden und Patienten mit Thalassämie völlig in vitro durch.

Die Untersuchungen der DNS-Synthesedauer am Menschen beschränken sich bisher auf normale und maligne Zellen der Hämpoese in Blut und Knochenmark sowie einige Tumorzellen (siehe Tabellen Va + Vb).

Angaben über die DNS-Synthesezeit von normalen oder pathologischen Lymphdrüsenzellen sind in der Literatur, soweit sie uns zur Verfügung steht, noch nicht vorhanden. Diese Arbeit befaßt sich mit Lymphknoten-zellen von Patienten mit chronischer Lymphadenose. Untersuchungen an Lymphknoten ohne leukämische Infiltrationen werden in unserem Labor zur Zeit durchgeführt. Bevor ich die von uns angewandte Methode im einzelnen schildere, möchte ich das Wesen und die Klinik der chronischen lymphatischen Leukämie beschreiben und auf einige Veränderungen eingehen, die sie an Bau und Funktion der Lymphknoten und Lymphozyten hervorruft.

II. Lymphknoten und Lymphozyt bei chronischer Lymphadenose

A) Die chronische lymphatische Leukämie

LENNERT ⁴⁴ beschreibt die Krankheit als relativ gleichmäßige, nicht knotenförmige Infiltration der blutbildenden Organe, wie Milz, Leber und Knochenmark, mit weitgehend generalisierter Lymphknotenschwellung geringen bis mäßigen Grades. Nach LEIBER ⁴¹ handelt es sich um eine irreversible Systemhyperplasie des lymphatischen und lymphoiden, blutzellenbildenden Parenchyms. DAMESHEK ^{14, 15} schließlich definiert die Erkrankung als generalisierte fortschreitende neoplastische Proliferation des lymphatischen Gewebes, vor allem der kleinen lymphatischen Zellen. Er zählt sie zu den immunoproliferativen Erkrankungen, da immunologische Abnormalitäten auftreten, die einen weitgehenden Verlust der immunologischen Fähigkeiten zur Folge haben, und häufig eine Autoimmunerkrankung als Komplikation auftritt. Da die chronische Lymphadenose

öfters in zwei Generationen derselben Familie vorkommt, wird ein genetischer Defekt als ätiologischer Faktor diskutiert ⁴⁰. Während bisher weder ein Virusinfekt noch ionisierende Strahlungen als Krankheitsursache in Frage kommen, könnte eine Fehlentwicklung des immunologischen Apparates eine ursächliche Rolle spielen ¹⁵.

a) Krankheitsverlauf

Die chronische Lymphadenose tritt vor allem jenseits des dreißigsten Lebensjahres auf, kann aber in jedem Alter beginnen. Man kennt verschiedene Verlaufsformen, die von einer "benignen" Form, die über viele Jahre symptomfrei bleibt und keine Therapie erfordert, bis zu einer aggressiveren Form reichen, die durch ständig wachsende lymphatische Gewebsmassen, hämolytische und infektiöse Komplikationen, Therapieresistenz und relativ kurze Überlebenszeit gekennzeichnet ist ⁷⁰. Zwischen diesen beiden Extremen sind die meisten Krankheitsverläufe einzuordnen. In der Mehrzahl der Fälle kann man, mehr oder weniger ausgeprägt, folgende Stadien verfolgen: Zunächst ist der Patient völlig beschwerdefrei, es läßt sich nur ein Anstieg der Lymphozytenzahl im peripheren Blut und Knochenmark feststellen. Nach einer Zeitspanne, die zwischen wenigen Monaten und mehreren Jahren schwanken kann, treten Lymphknotenschwellungen auf. Die Knoten sind mittelhart, gut voneinander abzugrenzen und gut verschieblich; sie werden zunächst an Hals, Achselhöhlen und Leistenbeugen gefunden. Oft besteht dazu eine Splenomegalie, die aber selten solche Ausmaße wie bei der chronischen Myelose annimmt. Das Allgemeinbefinden ist weiter zufriedenstellend, es kommt jedoch häufig zu Nachtschweiß. Die Vermehrung des lymphatischen Gewebes nimmt weiter zu, es treten häufig Hautinfiltrationen mit für den Patienten unangenehmen

Begleiterscheinungen wie Jucken, Beißen etc.. Dazu wird der Patient nicht selten von Infektionen befallen. Im Endstadium, das über eine mögliche Kachexie zum Tode führt, ist die Symptomatik voll ausgeprägt. Fieberattacken und Infektionen aller Art können beobachtet werden, die verschiedensten Organe, wie Haut, Leber, Lungen und Nasennebenhöhlen sind beteiligt. Bei mindestens einem Fünftel aller Fälle ergeben sich im Verlauf der Erkrankung autoimmunologische Komplikationen. Die hämolytische Anämie steht der Häufigkeit nach an der Spitze, aber auch Vasculitis, Thyreoiditis, rheumatische Arthritis und Lupus erythematodes kommen vor ¹⁵.

b) Laborbefunde

Je nach dem peripheren Blutbild kann man eine aleukämische (unter 3000 Leukozyten pro cmm), eine subleukämische (über 3000 Leukozyten pro cmm) und eine leukämische (über 20000 Leukozyten pro cmm) Verlaufsform unterscheiden ⁴⁴. In der Mehrzahl der Fälle steigt die Leukozytenzahl stetig an und erreicht im Endstadium Werte bis zu 500000 Leukozyten pro cmm. Das Differentialblutbild zeigt zunächst 60 - 80 % morphologisch reif erscheinender lymphatischer Zellen, der Prozentsatz wächst, bis das weiße Blutbild fast nur noch aus diesen Zellen besteht. Die Anämie, kenntlich am Absinken des Hämoglobingehaltes und der Erythrozytenzahlen, die über lange Zeit geringfügig sein kann, verschlechtert sich während der letzten Stadien rapide. Das Knochenmark erscheint immer mehr mit lymphatischen Zellen vollgepackt. Ausgeprägte Veränderungen finden sich meist im Serumeiweißbild, die allerdings in verschiedene Richtungen gehen können. Die gamma-Globuline sind oft so stark vermindert, daß es zu einem Antikörpermangel-syndrom kommt, ebenso oft sind sie aber auch vermehrt.

B) Der Lymphknoten

a) Bau und Funktion des normalen Lymphknotens

Eine genaue Schilderung des histologischen Aufbaues des normalen Lymphknotens geben LENNERT ⁴³ und LEIBER ⁴¹. Besonders wichtig sind die Keimzentren der Lymphfollikel und das lymphatische Gewebe (Pulpa) um die Markstränge der Lymphknoten (Sinus), da sich in ihnen die Lymphozytenbildung abspielt. Im Gegensatz zur früheren Auffassung, daß die Lymphknoten die einzige Bildungsstätte der Lymphozyten seien, steht heute jedoch fest, daß sie in allen lymphatischen Geweben des Körpers entstehen können ⁸³. Nach GRUND-MANN ²³ werden im Lymphknoten zwei verschiedene Populationen von Lymphozyten gebildet, und zwar die Follikellymphozyten in den Keimzentren und die Sinuslymphozyten in der Pulpa nahe den Sinus (= Pulpalymphozyten ⁴³). Beide Entwicklungsreihen gehen von Retikulumzellen aus und führen über mehrere Stufen zu den reifen Lymphozytenformen. Die beiden lymphopoetischen Reihen, die einmal über die Germinoblasten (zu Follikellymphozyten) und das andere Mal über die Lymphoblasten (zu Sinuslymphozyten) verlaufen, unterscheiden sich voneinander durch Einzelheiten der Kern- und Zellgestalt. Die Vorstufen lassen sich jedoch nicht so sicher trennen wie die reifen Zellen. Die Follikellymphozyten enthalten einen großen Nukleolus in einem lockeren Kern und wenige Plasmogranula in einem schmalen Plasmasaum, die Sinuslymphozyten dagegen weisen viele kleine Nukleoli in einem dichteren Kern und ein breiteres Plasma mit mehr Plasmogranula auf. Beim erwachsenen Menschen stehen die Follikellymphozyten zu den Pulpalymphozyten im Verhältnis 10 : 1, was wahrscheinlich mit den verschiedenen Lebensdauern der beiden Populationen zusammenhängt.

Die Funktion des normalen Lymphknotens erschöpft sich nicht in der Bildung von Lymphozyten. Seine Keimzentren, die auch als Reaktionszentren bezeichnet werden, dienen der Abwehr²³. Die Lymphknoten betätigen sich als Filter der Körperlymphe.

In einem histologischen Präparat eines Lymphknotens läßt sich deutlich die typische mikroskopische Architektur mit Kapsel und Trabekeln, Follikeln und Pulpa erkennen. An Schnitten und Ausstrichen normaler Lymphknoten kann man verschiedene Zellen unterscheiden. Neben den beiden Lymphozytenformen sieht man deren Vorstufen, außerdem verschiedene retikuläre Elemente. LENNERT⁴³ veröffentlichte ein Adenogramm von Lymphknoten mit unspezifischer Lymphadenitis, das durch Auszählen von 38 Ausstrichen gewonnen wurde (siehe Tabelle I). Es wurden nur solche Fälle verwendet, die histologisch keine stärkere Hyperplasie der einen oder anderen Zellrasse aufwiesen, sodaß man von einem "normalen" Adenogramm sprechen kann.

b) Der Lymphknoten bei chronischer Lymphadenose

Die Lymphknoten der chronischen Lymphadenose sind vergrößert, saftreich, von weicher Konsistenz und am Durchschnitt von grauweißer Farbe. Oft sind größere Gruppen von Lymphknoten betroffen, sodaß geschwulstartige Pakete entstehen können. Makroskopisch erscheinen die Grenzen der einzelnen Lymphknoten noch gewahrt, mikroskopisch läßt sich erkennen, daß die Kapsel an einzelnen Stellen von leukämischen Infiltrationen durchbrochen ist. Ein infiltrierend destruierendes Wachstum wird dabei jedoch nicht beobachtet⁴⁴. Die normale architektonische Struktur des Lymphknotens geht schon in den früheren Stadien der Erkrankung verloren, die retikulären Elemente werden fast völlig

Tabelle I

"Normales" Adenogramm von 38 Ausstrichen bei unspezifischer Lymphadenitis

Lymphozyten	jung	620,1	945,2
	alt	325,1	
Basophile Stammzellen		0,4	0,4
Germinoblasten	groß	1,0	4,8
	mittel u. klein	3,8	
Plasmoblasten		1,1	
Proplasmazellen		1,0	3,8
Plasmazellen		1,7	
Retikuläre Reizzellen	groß ⁺	3,8	20,5
	mittel ⁺⁺	15,1	
	klein ⁺⁺⁺	1,6	
Retikulumzellen mittl. u. groß		10,4	
Histiozyten (u. "Monozyten")		3,2	15,05
Kerntrümmerphagen		0,15	
Epitheloidzellen		1,3	
Gewebsmastzellen		1,3	
Blutmastzellen		0,5	
Eosinophile		1,0	10,15
Neutrophile		7,2	
Myelozyten? (Gewebsneutrophile?)		0,15	
		1000,00	1000,00

⁺ = Meist Übergangsformen von Retikulumzellen zu basophilen Stammzellen und Germinoblasten

⁺⁺ = Vorwiegend Lymphoblasten und unreife Histiozyten

⁺⁺⁺ = Vorwiegend "lymphoide Retikulumzellen"

(Nach LENNERT 1961 ⁴³)

von einer sehr einförmigen lymphatischen Hyperplasie mit maximaler Zelldichte verdrängt ⁴¹. Bei der reifzelligen Lymphadenose, der klassischen chronischen lymphatischen Leukämie der Erwachsenen, sind im Schnittpräparat beinahe ausschließlich kleine lymphatische Zellen zu sehen, die zwar pathologisch sind, sich jedoch morphologisch nicht unbedingt von normalen kleinen Lymphozyten unterscheiden. Vor allem in Ausstrichen kann man neben diesen kleinen Zellen mit dichtem Chromatin auch größere Vorstufen mit feinerem Chromatingerüst sehen. Bei Wachstumsschüben können die Vorstufen vermehrt sein. Dann kann man auch reichlich Mitosen erkennen, die in den sonst lymphoblastenarmen Präparaten nur in kleinster Anzahl auftreten. In Ausstrichen kann man auch vereinzelt Retikulumzellen und Makrophagen entdecken.

Die beiden Lymphozytenformen, die wir im normalen Lymphknoten unterschieden haben, kommen auch bei den chronischen Lymphadenosen vor. Allerdings überwiegen auch hier die Follikellymphozyten bei weitem. GRUNDMANN ²³ konnte unter 11 chronischen Lymphadenosen nur einen Fall differenzieren, bei dem die Sinuslymphozyten über die Hälfte aller Lymphozyten ausmachten. Bei dieser Sinuslymphadenose handelte es sich um eine schleichend verlaufende Form mit einer nur geringgradigen Erhöhung der Leukozyten auf 20000 pro cmm, davon 72% Lymphozyten. Die zehn Follikellymphadenosen hatten eine typische Verlaufsform mit Leukozytenzahlen über 100000 pro cmm, von denen etwa 95 % Lymphozyten waren. Allerdings können die Follikellymphozyten bei der Lymphadenose aufgrund der allen Tumorzellen eigenen Polymorphie auch mehrere Nukleolen besitzen.

C) Der Lymphozyt -

Vergleich zwischen normalen Lymphozyten und
lymphatischen Zellen bei chronischer Lymphadenose.

1) Vorkommen und Morphologie

Die Lymphozyten sind mit 20 - 35 % aller weißen Blutzellen ein wichtiger Bestandteil des strömenden Blutes. In den lymphatischen Organen liegen noch 30 bis 40mal mehr Lymphozyten als im Blut und nach YOFFEY⁸³ beinahe ebensoviele im Knochenmark. Das Gesamtgewicht des im Organismus des Erwachsenen verteilten lymphatischen Gewebes beträgt bis zu 1500 g. Ob diese Zahlen verbindlich sind, mag diskutiert werden, fest steht jedenfalls, daß nur knapp 1% der Lymphozyten im Blut kreisen. Der Lymphozyt ist also primär eine Gewebszelle, die ein eigenes Parenchym bildet und mit Ausnahme des Zentralnervensystems alle anderen Gewebe durchsetzt²³. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Lymphozytenneubildung in allen lymphatischen Organen und Geweben vor sich geht, ebenso, daß zwei verschiedene Lymphozytenpopulationen gebildet werden. Das lichtmikroskopische und das elektronenmikroskopische Bild der Lymphozyten und ihrer Vorstufen werden bei LENNERT⁴³, LEIBER⁴¹ und BESSIS³ ausführlich beschrieben. Außer den Follikel- und Sinuslymphozyten unterscheidet man große, mittlere und kleine Lymphozyten. Dabei handelt es sich allerdings um Reifungsformen derselben Zelle, die Entwicklung vollzieht sich vom großen über den mittleren zum kleinen Lymphozyten^{18, 7}.

Die lymphatischen Zellen der chronischen Lymphadenose sind meist klein, man findet aber auch größere Vorstufen. Morphologisch lassen sich diese

Zellen nicht ohne weiteres von den normalen Lymphozyten unterscheiden. Die Lymphozyten im peripheren Blut eines Patienten mit chronischer Lymphadenose stellen eine Mischung aus wenigen normalen und einer weit überwiegenden Zahl von leukämischen Zellen dar ⁷⁰. Dabei kann man mindestens eine normale Lymphozytenpopulation und mindestens zwei leukämische Populationen finden ⁷⁰. Die Zahl der Lymphozyten im peripheren Blut kann bei der chronischen Lymphadenose bis zu 500000 pro cmm vermehrt sein.

2) Die Lebensdauer der Lymphozyten

Die Menge der gebildeten Lymphozyten ist von vielen Faktoren abhängig, eine wichtige Rolle spielt das Lebensalter. Jugendliche Individuen haben in ihren großen lymphatischen Organen eine wesentlich stärkere Neubildungsrate als ältere ²³. Kleinkinder haben z.B. im peripheren Blut etwa 6000 Lymphozyten pro cmm (50 - 70 % von 10000 oder mehr Leukozyten), während Erwachsene nur 1000 - 3000 Lymphozyten pro cmm aufweisen (20 - 35 % der 5000 - 8000 Leukozyten). Beim Erwachsenen, wie bei den meisten Säugetieren, reicht die aus dem Ductus thoracicus in das periphere Blut ausströmende Lymphozytenmenge aus, die zirkulierenden Lymphozyten siebenmal täglich zu ersetzen ¹⁴. Da der Blutspiegel normalerweise ziemlich konstant bleibt, schloß man daraus auf eine sehr kurze Lebensdauer von höchstens ein paar Stunden. Eine Neubildung in dem Ausmaß, wie sie für eine so kurze Lebenszeit nötig wäre, ist jedoch nicht möglich, da die lymphatischen Gewebe des Erwachsenen nur eine sehr geringe Proliferationsrate aufweisen. Auch Isotopenmarkierungen der Lymphozyten bestätigten diese Ansicht, sie ergaben wesentlich längere Lebensdauern (siehe Tabelle II).

Tabelle II

Lebensdauer von Lymphozyten

- a) Normale Lymphozyten des Menschen
 b) Lymphozyten bei chronischer Lymphadenose des Menschen
 c) Normale Lymphozyten der Ratte

Autor	Methode	Zellart	Lebensdauer in Tagen
a) OTTESEN 1954 60	DNS-P32	Lymphozyten	I) 3 - 4 Tage (20%) II) 100-200 Tg. (80%)
NORMAN 1965 55	Chromos. Fragm.	Lymphozyten nach RÖ. bei Frauen	530 ± 64 Tage
b) OSGOOD 1952 57	DNS-P32	Leukozyten bei CLL	30 Tage
OSGOOD 1954 58	DNS-P32	Lymphozyten bei CLL	84 Tage
HAMILTON 1957 24	DNS-C14	Leukozyten bei CLL	I) 85 Tage II) 300 Tage
HAMILTON 1959 26	DNS-C14	Leukozyten bei CLL	30 - 85 Tage
c) LITTLE 1962 45	3H-Thym. Dauerinf.	große Lymphozyten kleine Lymphoz.	60 Tage 100 Tage
ROBINSON 1965 66	3H-Thym. Dauerinf.	kleine Lymphoz.	I) 30 Tage (über 90%) II) über 270 Tg. (5-8%)

Beim normalen Lymphozyten des Menschen fand OTTESEN ⁶⁰ mit einer ³²P-Markierung zwei verschiedene Gruppen. Etwa 20% der Lymphozyten hatten eine mittlere Lebensdauer von nur 3 - 4 Tagen, während 80% zwischen 100 und 200 Tagen überlebten. NORMAN ⁵⁵ ermittelte bei Patientinnen mit Uteruscarcinomen, die therapeutisch mit hohen Dosen bestrahlt worden waren, sogar Lymphozytenlebensdauern von 530 ± 64 Tagen. Er wandte jedoch keine autoradiographische Methode an, sondern berechnete seinen Wert aus dem zeitlichen Rückgang des Prozentsatzes mit azentrischen Chromosomenfragmenten, wie sie nach Bestrahlung auftreten.

Der Vollständigkeit halber möchte ich zwei Werte, die an gesunden Ratten gewonnen wurden, wiedergeben. LITTLE ⁴⁵ bestimmte für kleine Lymphozyten Überlebensdauern von 100 Tagen, für große Lymphozyten von 60 Tagen. ROBINSON ⁶⁶ unterschied zwei Gruppen von kleinen Lymphozyten, die weitaus größere (über 90%) überlebte ungefähr 30 Tage, die kleinere (5-8%) mehr als 270 Tage.

Über die Lebensdauer von Lymphozyten bei chronischer Lymphadenose des Menschen liegen Beobachtungen von zwei Autoren vor. OSGOOD ^{57, 58} untersuchte den Einbau von ³²P in die DNS von Patienten mit CLL und ermittelte für die leukämischen Lymphozyten Lebenszeiten von 30 Tagen ⁵⁷ bzw. 84 Tagen ⁵⁸. HAMILTON ^{24, 26} markierte die CLL-Lymphozyten mit ¹⁴C-Thymidin und fand Lebensdauern von 85 bzw. 300 Tagen ²⁴, und solche von 30 - 85 Tagen ²⁶.

3) Rezirkulation der Lymphozyten

Die Diskrepanz zwischen dem häufigen täglichen Zellersatz der Lymphozyten im Blut und ihrer langen Lebensdauer führte zu dem Schluß, daß sie nur einen kleinen Teil ihres Lebens im Blut verbringen. Es findet eine Zirkulation der Lymphozyten statt ¹⁴, ²⁰, ²¹, ²³, ⁶¹, ⁷⁰. Die im lymphatischen Gewebe gebildeten Lymphozyten, die über den Ductus thoracicus ins Blut geströmt sind, gelangen von dort wieder zurück in die lymphatischen Organe und das diffuse lymphatische Gewebe, werden dort abgelagert, um dann bei Bedarf wieder ins Blut oder an eine andere Stelle transportiert zu werden.

Bei der chronischen Lymphadenose scheint eine Störung dieser Rezirkulation vorzuliegen. Der langlebige Lymphozyt dieser Krankheit vermeidet den raschen Wechsel vom lymphatischen Gewebe ins Blut und umgekehrt. Verbindungsmöglichkeiten der im Blut gefundenen leukämischen Lymphozyten zu anderen Lymphozyten außerhalb des Blutes bestehen jedoch ⁷⁰.

4) Die Funktion der Lymphozyten.

Lymphozyten müssen nicht immer Mitglieder ihrer eigenen Zellreihe bleiben, eine Umwandlung in Plasmazellen und in Stammzellen der erythropoetischen und granulopoetischen Reihe wird diskutiert.⁷, ¹⁵, ²³. Es ist bekannt, daß die kleinen Lymphozyten auf eine Reizung durch Phytohaemagglutinin (PHA) mit einer Umwandlung in große blastenähnliche Zellen reagieren, die alle Zeichen der Primitivität besitzen. Während sich nur wenige der normalen kleinen Lymphozyten teilen können ¹⁴, haben diese "Blasten" allgemein die Fähigkeit,

synthetisieren und sich zu teilen ^{15, 28}. Ebenso wie durch PHA kann diese Transformation auch durch verschiedene Antigene erreicht werden. Allgemein kann man heute sagen, daß sich der kleine Lymphozyt auf einen immunologischen Reiz hin in eine primitive Zelle, den "Immunoblast" ¹⁵ verwandelt. Diese primitiven Zellen haben zum einen die Möglichkeit zu proliferieren und große Lymphozyten zu bilden, die wieder zu mittleren und kleinen Lymphozyten reifen. Zum anderen ist, wie schon angedeutet eine Differenzierung in andere Zellreihen wahrscheinlich möglich.

Lymphozyten und Plasmazyten spielen eine große Rolle bei Abwehrreaktionen des Körpers. Die langlebige Fraktion der kleinen Lymphozyten scheint direkt verantwortlich für die 'Allergie vom verzögerten Typ' zu sein ⁷⁰, es tritt dabei eine starke Lymphozytose auf. Die Plasmazellen dagegen, evtl. auch aus den "Immunoblasten" entstanden, treten vermehrt bei der humoralen Antikörperreaktion auf. BRAUNSTEINER ⁷ entwickelte über die Funktion der Lymphozyten folgende Hypothese: Gelangen in den Körper eingedrungene körperfremde Stoffe in das lymphatische System, werden Lymphozyten, die auf diesen Reiz spezifische Abwehrstoffe in sich gebildet haben, auf dem Blutweg zum Ort des Bedarfs geschickt, wo sie in das Gewebe einwandern und als Rundzellen sessil werden. Sie reagieren mit dem Erregerantigen und lokalisieren den Prozeß. Bei der Infektabwehr scheinen die verschiedenen weißen Blutzellsysteme voneinander unabhängige, jedoch koordinierte Funktionen auszuüben. Die zellständige Abwehr erfolgt durch den Lymphozyten und die sich daraus ableitenden Zellen, die Phagozytose durch Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, und die plasmatische Antikörperbildung durch die Plasmazellen.

Die Rolle, welche die Lymphozyten bei der Allergie vom verzögerten Typ spielen, wird besonders deutlich beim Krankheitsbild der Alymphozytose. Bei dieser Erkrankung fehlen sowohl die Plasmazellen als auch die Lymphozyten⁷. Die durch das Fehlen der Plasmazellen bedingte Agammaglobulinämie kann substituiert werden, bakterielle Infekte können somit gut überstanden werden. Es besteht jedoch eine außerordentliche Anfälligkeit gegenüber Virusinfekten und Pilzbefall, also jene Krankheiten, bei denen die Allergie vom verzögerten Typ eine entscheidende Rolle spielt. Die Kinder gehen deshalb rasch zugrunde.

Auch bei der chronischen Lymphadenose ist die Allergie vom verzögerten Typ herabgesetzt. Die Lymphozyten sind nicht in der Lage, auf PHA, Antigene oder allgemein einen immunologischen Reiz mit der oben beschriebenen immunoproliferativen Reaktion zu antworten¹⁵. Da die leukämischen Lymphozyten nicht immunologisch reagieren, haben sie ein ruhigeres Leben als die normalen Lymphozyten, sie können länger an einem Ort verbleiben, ohne durch einen Reiz abgerufen zu werden. Es wäre möglich, daß die leukämischen Lymphozyten aufgrund dieser Trägheit die immunologisch und metabolisch aktiveren normalen Lymphozyten im Laufe der Zeit verdrängen. Mit dem schrittweisen Überhandnehmen der inkompetenten Zellen wird die immunologische Lage des Organismus dann immer mehr verschlechtert.¹⁵

Bis heute ist über den Grund der Entartung der normalen Lymphozyten und damit über den Mechanismus der Entstehung einer Lymphadenose sehr wenig bekannt. Ein Problem, das in diesem Zusammenhang sehr wichtig ist, stellt die Frage dar, ob die Vermehrung der Lymphozyten im peripheren Blut bei Lymphadenosen

Folge einer gesteigerten Proliferation oder einer im Durchschnitt verlängerten Lebensdauer ist (siehe auch 1, 4, 5, 15, 25, 34, 71, 77). Zur Aufklärung dieser Frage ist die Analyse des Zellzyklus dieser leukämischen Lymphozyten notwendig, sowie ein Vergleich der Ergebnisse mit solchen von Untersuchungen an normalen Lymphozyten. Ein Schritt auf diesem Weg soll diese Arbeit über die DNS-Synthesezeit der Lymphknotenzellen bei Patienten mit chronischer Lymphadenose sein.

III. Material und Methode unserer Untersuchungen

A) Patientenstamm

Alle acht Patienten, die wir untersuchten, waren an chronischer Lymphadenose erkrankt. Die Krankheitsdauer betrug zwischen drei Monaten und sieben Jahren. Einer der Patienten (K.F.) wurde bis drei Wochen vor unserer Untersuchung mit einem Cytostatikum (Velbe), zwei Patienten bis vier Wochen (L.W.) bzw. fünf Monate vorher (K.F.) mit Steroiden behandelt. Genauere Daten über Lymphknotenbefall, periphere Blutwerte und Krankheitsdauer können der Tabelle III entnommen werden. Alle darin angegebenen Werte beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, auf den Zeitraum unserer Untersuchung.

Im folgenden wird zunächst eine kurzgefaßte Kasuistik der einzelnen Patienten vorgelegt. Dabei sollen vor allem die Anamnese, der Krankheitsverlauf und die Komplikationen der einzelnen Fälle bis zum Zeitpunkt der Untersuchung zur Sprache gebracht werden.

Tabelle III

Patient	Alter Geschlecht	Lymphknoten	Leukozyten/cmm +I +II +III	% Lymphoz	Hb g%	Erythr. Mio/cmm	KP Jhr.	Therapie
R.A.	67 m	general.derb vergrößert	- 8900 14300	57	12,6	4,77	0,25	-
G.An.	57 m	general. bis pflaumengroß	70720 87812 131000	96	12,0	3,54	6	-
S.A.	64 m	general. bis kirschgroß	21800 16700 16500	77	13,8	4,41	0,5	-
F.T.	72 w	Nacken, Axilla derb vergröß.	115000 120300 120660	98	11,3	4,06	5	-
L.W.	74 m	Hals, Leiste haselnußgroß	21000 27486 13700	92	14,0	4,25	7	Urbason
G.Au.	52 m	Leisten, bohnen groß	25300 25340 9900	80	15,3	4,60	2	-
K.F.	47 m	Generalisiert erbsgroß	26350 193000 186000	99	11,2	3,30	1	Urbason Velbe
B.F.	62 w	general. bis faustgroß	- 173000 201000	99	13,2	4,07	2	-

Fall I (R.A.)

Anfang 1967 erkrankte der 67-jährige Patient mit stechenden Schmerzen am linken Rippenbogen, die sich beim Ein- und Ausatmen erheblich verstärkten. Er nahm innerhalb weniger Wochen stark an Gewicht ab, fühlte sich fortschreitend müde und abgeschlagen und litt unter nächtlichen Schweißausbrüchen. Es kam zu generalisierten, nicht schmerzhaften Lymphknotenschwellungen.

Bei der Klinikaufnahme im April desselben Jahres fielen außerdem eine bis in Nabelhöhe reichende Milz, eine derbe Leber, die auf 15 cm in der Medio-clavikularlinie (MCL) vergrößert war, auf. Es bestand eine leichte Anämie. Die Leukozyten lagen mit 8900 pro cmm noch im oberen Normbereich, das Differentialblutbild zeigte eine deutliche Vermehrung der Lymphozyten auf 54% und eine Monozytose von 16 %. Bei der Elektrophorese fiel eine Verminderung der Albumine (42 rel%) und eine Vermehrung der gamma-Globuline (21 rel%) auf. Eine Sternalpunktion sowie die histologische Untersuchung eines entfernten Lymphknotens sicherten die

^{+I} = Leukozyten pro cmm 2 - 8 Monate vor der Untersuchung

^{+II} = Leukozyten pro cmm 1 Monat vor der Untersuchung

^{+III} = Leukozyten pro cmm am Tag der Untersuchung

KD⁺⁺ = Krankheitsdauer in Jahren vor der Untersuchung

Therapie⁺⁺⁺ = Therapie mit Corticosteroiden oder Cyto-
statika in den 6 Monaten vor der Untersuchung

(Erläuterungen zu Tabelle III)

Diagnose einer reifzelligen Lymphadenose.

Die Markierung eines oberflächlichen Lymphknotens der rechten Leiste wurde am 5.5.1967 vorgenommen. Anschließend wurde eine Therapie mit Leukeran und Urbason eingeleitet.

Fall II (G.An.)

Im Herbst 1961 suchte der damals 51-jährige Patient wegen stark geschwollener Ohren mit nässenden Hauterscheinungen einen Arzt auf. Kurze Zeit später klagte er über schlechtes Allgemeinbefinden und Knoten im Bereich des Halses. Es wurde die Diagnose einer chronischen Lymphadenose gestellt. Einige Wochen, bevor er im September 1967 in unsere Klinik aufgenommen wurde, traten plötzlich bullöse stark juckende Hauterscheinungen an beiden Armen und auch an anderen Körperstellen auf. Auf Vioform-Salicyl-Vaseline und Calcistin-Salbe klangen die Effluoreszenzen, wahrscheinlich eine großblasige Dermatitis herpetiformis, rasch wieder ab.

Bei der Aufnahme wurden bis pflaumengroße Lymphknoten cervical, axillär und inguinal gefunden. Die Leberhöhe betrug 15 cm in der MCL, die Leber war 3 QF unter dem rechten Rippenbogen zu tasten. Die Milz war tastbar vergrößert. Es wurde eine leichte Anämie festgestellt. Es bestand eine starke Leukozytose von 144000 pro cmm, 98 % der weißen Blutzellen waren Lymphozyten.

Nach der Markierung eines oberflächlichen Lymphknotens der rechten Leiste wurde eine Behandlung mit Antihumanlymphozytenglobulin (AHLG) vom Pferd durchgeführt.

Fall III (S.A.)

Der 64-jährige Patient bemerkte im Juni 1967 Knoten am Hals, die bis über kirschgroß wurden. Gleichzeitig fiel ihm eine zunehmende Mattigkeit auf, verbunden mit häufigen Schweißausbrüchen. Im Dezember desselben Jahres wurde er in unsere Klinik aufgenommen, da sich die Lymphknotenschwellung weiter ausgedehnt hatte. Es wurde eine chronische Lymphadenose diagnostiziert.

Bei der Aufnahmeuntersuchung wurden neben den generalisiert tastbaren Lymphknoten eine auf 14 cm in der MCL vergrößerte Leber, die 4 QF unter dem rechten Rippenbogen zu tasten war, und ein großer, bis 5 QF unter den linken Rippenbogen reichender Milztumor festgestellt. Das rote Blutbild war normal, die Leukozytose mit 16100 Leukozyten pro cmm mäßig. Im Differentialblutbild waren die Lymphozyten auf 71 % vermehrt. Die Immunoelktrophorese ergab ein Antikörpermangel-syndrom (AMS). Die Diagnose wurde durch Myelotomie und Lymphknotenhistologie bestätigt.

Nach der Markierung eines Lymphknotens der rechten Leiste wurde eine Behandlung mit AHLG vom Pferd, anschließend mit Endoxan und Urbason durchgeführt. Fünf Monate nach der Markierung entwickelte der Patient eine akute Hepatitis, die rasch zu einem unbeeinflussbaren Coma hepaticum führte. Der Patient kam am 21.6.68 im akuten Nierenversagen ad exitum.

Fall IV (F.T.)

Seit Anfang 1963 fühlte sich die damals 67-jährige Patientin auffallend müde, hatte ständig Kopfschmerzen in beiden Schläfenregionen und bemerkte drei erbsgroße Anschwellungen am Hinterhaupt

sowie eine markstockgroße, flache und derbe Anschwellung vor dem rechten Ohr. Es wurde eine chronische Lymphadenose diagnostiziert, die sofort mit Endoxan behandelt wurde.

Bei einer Leukozytose von 48000 Leukozyten pro cmm waren 95 % Lymphozyten. In der Elektrophorese war eine leichte Verminderung der gamma-Globuline festzustellen. Milz und Leber waren damals nicht vergrößert, periphere Lymphknotenschwellungen konnten nur am rechten Kieferwinkel getastet werden. Die cytostatische Behandlung wurde nach Erhebung dieses Befundes wieder abgebrochen.

Im Lauf der Jahre nahmen die Ermüdungserscheinungen weiter zu, sodaß die Patientin im Herbst 1967 in unsere Klinik aufgenommen wurde. Die Leukozyten waren auf 114000 pro cmm angestiegen. Das Allgemeinbefinden besserte sich wieder, kurz darauf traten jedoch starke Schmerzen in beiden Kniegelenken auf. Bei der erneuten Klinikaufnahme im Januar 1968 wies die Patientin eine Arthrosis deformans beider Kniegelenke auf. Die derb vergrößerten Lymphknoten waren jetzt generalisiert zu tasten. Die Leber überragte den rechten Rippenbogen um 2 QF. Es bestand eine leichte Anämie, die Leukozytose schwankte um 100000 pro cmm. Als Ausdruck eines begleitenden AMS bestand eine Verminderung der gA-Globuline. An der linken Stirnseite wurde ein kleines Basaliom exzidiert.

Die Markierung eines inguinalen Lymphknotens erfolgte am 31.1.1968.

Fall V (L.W.)

Seit Ende 1961 fühlt sich der damals 68-jährige Patient leistungsgemindert. Er leidet unter Beklemmungen und stechenden Schmerzen in der Herzgegend, starkem Schwindel, vom Nacken hochziehenden Kopfschmerzen

und Schlafstörungen. Es wird eine chronische Lymphadenose festgestellt. Drei Jahre später wird der Patient zum ersten Male in unsere Klinik aufgenommen.

Im Halsbereich sind vergrößerte Lymphknoten zu tasten, Leber und Milz sind mäßig vergrößert. Das rote Blutbild ist normal, das weiße Blutbild zeigt eine Leukozytose von 30500 pro cmm, darunter 74 % Lymphozyten. Die gamma-Globuline sind auf 13 rel% erniedrigt. Die Diagnose wird durch eine Sternalpunktion erhärtet. In der Folgezeit wechselt das Allgemeinbefinden häufig, der Patient verliert an Gewicht. 1967 entwickelt sich ein Diabetes mellitus, der mit Rastinon behandelt wird. Die Lymphknotenschwellungen sind jetzt generalisiert, die Leber hat sich auf 16 cm in der MCL verbreitert. Es besteht eine deutliche Anämie mit einem Hb von 12,1 g% und 3,48 Millionen Erythrozyten pro cmm. Die Leukozytenzahl ist auf 91000 angestiegen, davon sind 95 % Lymphozyten. Im gleichen Jahr entsteht als Komplikation eine entzündliche Infiltration im rechten Mittel- und Unterfeld der Lunge, die unter Reverin mit gamma-Globulin wieder abklingt. Kurze Zeit später entwickelt sich ein neuer pulmonaler Infekt, der diesmal mit Paraxin therapiert wird.

Zum Zeitpunkt unserer Untersuchung mit Markierung eines inguinalen Lymphknotens rechts am 5.2. 1968 wies der Patient nur eine geringgradige Leukozytose von 13700 pro cmm auf. Es bestand ein ausgeprägtes AMS mit gamma-Globulin Werten um 9 rel%. Nach unserer Untersuchung wurde der Patient mit AHLG vom Pferd behandelt.

Fall VI (G.Au.)

Anfang 1966 bemerkt der 50-jährige Patient nach Belastung blaue Lippen, er fühlt stechende Schmerzen in der linken Thoraxhälfte, die in die

linke Schulter und in den linken Arm ausstrahlten. Die Atmung ist sehr schmerzhaft, es besteht dauernder Hustenreiz. Bei einer ambulanten Untersuchung fällt eine Leukozytose von 24000 pro cmm auf, kurz danach wird eine chronische Lymphadenose diagnostiziert. Bei der Klinikaufnahme im Oktober desselben Jahres war die Leber auf 13 cm in der MCL verbreitert, in der Leiste waren erbsgroße Lymphknoten zu tasten. Von den 21550 Leukozyten waren 76 % Lymphozyten. Eine während des Klinikaufenthaltes durchgeführte Myelotomie bestätigte die Diagnose. Es kam zu einer pulmonalen Infektion mit basalen Infiltrationen rechts, die mit Paraxin erfolgreich behandelt wurde. Einige Zeit nach der Entlassung klagte der Patient über sehr verschlechtertes Allgemeinbefinden mit Müdigkeit, Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindelgefühl. Der Patient mußte erneut aufgenommen werden.

Am 28.3.68 wurde die Markierung eines Lymphknotens der linken Leistenbeuge vorgenommen. Anschließend wurde eine Therapie mit AHLG vom Pferd versucht, die aber nach der ersten Injektion abgebrochen werden mußte, da der Patient eine umfangreiche Urticaria entwickelte. Nach dem Abklingen der Hauterscheinungen wurde eine Behandlung mit Leukeran und Urbason eingeleitet.

Fall VII (K.F.)

Anfang 1967 bemerkte der 46-jährige Patient einen deutlichen Leistungsabfall, eine fortschreitende Gewichtsabnahme und eine zunehmende Blässe. Es wurde eine reifzellige Lymphadenose festgestellt, der Patient wurde mit Leukeran behandelt. Die stationäre Aufnahme in unsere Klinik erfolgte im Juni 1967, da der Patient eine plötzlich auftretende Spannung im rechten Unterschenkel mit starkem Berührungsschmerz verspürte. Es handelte sich um eine Thrombophlebitis, die unter geeigneter Therapie rasch wieder abklang.

Bei der Aufnahmeuntersuchung bot der stark vorgealterte Patient multiple erbsgroße Lymphknoten. Die Leber war 2 QF unterhalb des rechten Rippenbogens zu tasten, der Milzrand reichte bis in Nabelhöhe. Bei der Laboruntersuchung ergaben sich neben einer Leukozytose von 64000 pro cmm, davon 100 % Lymphozyten, eine schwere Thrombopenie von 4000 pro cmm, eine starke Anämie mit einem Hb von 7,4 g% und 2,74 Millionen Erythrozyten pro cmm und ein AMS mit gamma-Globulinwerten um 7 rel%. Ein Sternalmarkausstrich wies zunächst auf eine atypische Lymphadenose hin, eine später durchgeführte Myelotomie brachte die Bestätigung der reifzelligen Lymphadenose.

Unter rapider Verschlechterung des Allgemeinzustands kam es zu einem Anstieg der Leukozyten auf 240000 pro cmm, der wegen der Thrombopenie nur mit Urbason behandelt wurde. Der therapeutische Erfolg der zunächst hohen Dosen bis 200 mg pro die war anfangs zufriedenstellend, die Leukozyten sanken auf 30000 pro cmm, die Thrombozyten stiegen auf 60000 pro cmm und das Hb steigerte sich auf 13,8 g%. Dann entwickelte sich jedoch ein schwerer Steroiddiabetes mit Blutzuckerwerten bis zu 275 mg%. Dazu kam es zu einem septischen Zustandsbild als Ausdruck einer schweren Pneumonie. Im linken Oberfeld fand sich eine kirsch-kerngroße Hohlraumbildung mit entzündlicher Umgebungsreaktion, sodaß der Verdacht der Reaktivierung einer Tuberkulose durch Prednisolon bestand, obwohl keine Tuberkelbakterien nachgewiesen werden konnten. Durch eine kombinierte Behandlung mit Antibiotika, Tuberkulostatika, hohen gamma-Globulingaben und Urbason wurde ein Abklingen des bedrohlichen Zustandes erreicht.

Der Patient konnte vorübergehend entlassen werden, im April 1968 wurde jedoch eine erneute

Aufnahme notwendig, da sich die Anämie wieder verschlimmert hatte (Hb 6,8 g%; 2,48 Millionen Erythrozyten pro cmm), die Thrombozyten auf 12000 pro cmm abgesunken waren und die Leukozyten auf 193000 pro cmm angestiegen waren. Mit gewaschenen Erythrozyten, Thrombozytenkonzentraten, Velbe, Endoxan und Urbason gelang nochmals eine Verbesserung des klinischen Bildes.

Am 10.5.1968 wurde die Markierung eines oberflächlichen Lymphknotens der rechten Leiste durchgeführt.

Fall VIII (B.P.)

Die 60-jährige Patientin bemerkte 1966 Lymphknotenschwellungen unter der linken Achsel, im darauffolgenden Jahr auch in den Leistenbeugen und am Hals. Die Mandeln waren stark geschwollen, es traten zusehends Schluckbeschwerden auf. Ambulant wurde eine chronische Lymphadenose diagnostiziert. Es bestand eine Leukozytose von 111000 pro cmm, davon waren 93 % kleine und 2 % große Lymphozyten. Bei der Aufnahme im Juni 1968 waren die Leukozyten auf 200000 pro cmm angestiegen, das Differentialblutbild zeigte jetzt bis zu 99 % Lymphozyten. Als Ausdruck eines begleitenden Antikörpermangel-syndroms waren die gamma-Globuline auf 12 rel% verringert. Eine während des stationären Aufenthaltes durchgeführte Myelotomie bestätigte die chronische Lymphadenose.

Am 19.6.1968 wurde ein Lymphknoten rechts inguinal markiert. Da sich die Beschwerden der Lymphadenose lediglich lokal äußerten, wurde zunächst auf eine Chemotherapie verzichtet und eine Gammatronbestrahlung der Halslymphknoten durchgeführt.

B) Methodik

1) Lokale Markierung eines oberflächlichen inguinalen Lymphknotens in vivo nach der Methode von TSIRIMBAS ⁷⁸.

Durch Palpation wird ein geeigneter Lymphknoten ausfindig gemacht. Nach Lokalanästhesie mit Novocain erfolgt nach Hautschnitt Freipräparieren des Lymphknotens ohne Durchtrennung der Gefäßversorgung. Dann wird eine Lymphographienadel durch die Kapsel in den Lymphknoten appliziert und über eine Infusionsleitung mit einer Perfusionsspritze verbunden, die an ein Perfusionsgerät angeschlossen ist (Unita I von B.Braun Melsungen). Mit diesem Perfusor werden nach einem genauen Zeitschema radioaktive Thymidinverbindungen (The Radiochemical Centre, Amersham, England) lokal in den Lymphknoten infundiert. Die Markierungssubstanzen ^3H -Thymidin (spez.Aktiv. 2,0 C/mM) und ^{14}C -Thymidin (spez.Aktiv. 55,8 mC/mM) stehen uns in den Verdünnungen 100 μC pro ml Flüssigkeit (^3H -Thymidin) bzw. 60 μC pro ml Flüssigkeit (^{14}C -Thymidin) zur Verfügung. Es werden 5 ml-Perfusionsspritzen verwendet, mit dem Perfusor auf Stufe 8 werden pro Minute 0,1 ml in den Lymphknoten infundiert. Die Markierungssubstanzen werden mit blutisotoner Ringerlösung gemischt. Zur Injektion werden 0,1 ml ^3H -Thymidin ad 3 ml Ringerlösung bzw. 0,1 ml ^{14}C -Thymidin ad 1,5 ml Ringerlösung benötigt. Da bei der Perfusion jeweils 0,7 ml in der Infusionsleitung zurückbleiben, müssen, damit die genannten Mengen in den Lymphknoten infundiert werden können, 0,12 ml ^3H -Thymidin ad 3,7 ml Ringerlösung bzw. 0,15 ml ^{14}C -Thymidin ad 2,2 ml Ringerlösung in die Perfusionsspritzen aufgezogen werden. Die Markierung verläuft nach folgendem Schema:

a) Infusion von 0,1 ml ^3H -Thymidin ad 3 ml Ringerlösung, entsprechend 10 μC ^3H -Thymidin innerhalb 30 Minuten

b) Pause von 10 Minuten

c) Infusion von 0,1 ml ^{14}C -Thymidin ad 1,5 ml Ringerlösung, entsprechend 6 μC ^{14}C -Thymidin innerhalb 15 Minuten

d) Pause von 5 Minuten

e) Exzision des markierten Lymphknotens innerhalb der nächsten 10 Minuten

f) Fixieren des Materials

2) Anfertigung von Ausstrichen und Schnitten

Der exzidierte Lymphknoten wird von allem überflüssigen Gewebe, wie z.B. Fettgewebsresten, gesäubert und in ca. 4 mm dicke Scheiben zerteilt. Davon werden zunächst Ausstriche angefertigt, die durch Trocknen an der Luft vorfixiert und durch späteres Einstellen in absolutes Methanol 20 Minuten lang fixiert werden.

Die Gewebsscheiben werden dann mindestens 24 Stunden lang in 4%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert. Zur weiteren Bearbeitung wird das Gewebswasser der Lymphknotenscheiben durch gut schneidbares Paraffin ersetzt. Dazu muß das Gewebe zuerst gewässert werden, dann durch Einlegen in eine aufsteigende Alkoholreihe wieder entwässert. Da sich Paraffin in Alkohol lösen würde, werden die Scheiben durch Xylol wieder entalkoholisiert.

Das Zeitschema für die Paraffineinbettung hat folgendes Aussehen:

20 min	Wässern unter fließendem Leitungswasser
50 min	50 %iger Alkohol (vergälltes Athanol)
60 min	70 %iger Alkohol
60 min	80 %iger Alkohol
50 min	96 %iger Alkohol
20 min	100 %iger Alkohol
20 min	100 %iger Alkohol
15 min	Xylol
10 min	Xylol

Die eigentliche Einbettung wird im Brutschrank bei etwa 60°C vorgenommen. Die Gewebsscheiben werden dabei in geschmolzenes Paraffin von immer höherem Schmelzpunkt eingelegt:

50 min	Paraffin I	(Schmelzpkt. 41-43°C)
65 min	Paraffin II	(Schmelzpkt. 51-53°C)
75 min	Paraffin III	(Schmelzpkt. 56-58°C)

Die auf diese Weise vorbereiteten Gewebsstücke werden dann in mit "hartem" Paraffin (hoher Schmelzpunkt) gefüllte Rahmen eingebettet. Das Paraffin erhärtet sich bei Zimmertemperatur rasch. Wird der Rahmen nach einigen Stunden gelöst, bleibt ein fester Paraffinblock zurück, in den das Präparat eingebettet ist. Der Block wird auf Holz gezogen und bis zum Schneiden im Kühlschrank verwahrt.

Das Schneiden der Blöcke erfolgt mit einem Schlittenmikrotom, dessen keilförmiges Messer quer zum Block eingestellt wird und gegen die Horizontale um 4° geneigt ist. Die Schnittdicke soll 4 μ nicht überschreiten. Zwischen den einzelnen Schneidevorgängen wird der Block immer wieder geeist. Die Schnitte

werden auf einem mit Aqua destillata überzogenen Objektträger vorläufig gestreckt und dann in ein Wasserbad von ca. 40°C gelegt, wo sie weiter gestreckt werden. Nach sehr kurzer Zeit - sonst löst sich das Gewebe auf - werden die Schnitte aus dem Wasserbad genommen und auf einen mit einer dünnen Schicht Eiweiß-Glycerin überzogenen Objektträger aufgezogen.

Die getrockneten Schnitte werden kurz in einen Brutschrank (60°C) eingestellt und dann entparaffiniert. Durch diesen Vorgang werden auch radioaktive Substanzreste, die nicht in die DNS eingebaut wurden, ausgewaschen und damit der später auftretende Nulleffekt vermindert.

Schema zur Entparaffinierung

30 min	Xylol
10 min	Xylol
5 min	100 %iger Alkohol (reines Äthanol)
5 min	96 %iger Alkohol
5 min	70 %iger Alkohol
20 min	Aqua destillata
25 min	Aqua destillata

3. Färbung der Präparate nach Feulgen

Es wurde die Feulgen-Kernfärbung verwendet und auf eine Plasma-Gegenfärbung verzichtet, da eine morphologische Differenzierung der Zellen nicht notwendig war. Im Gegensatz zu den Färbungen mit basischen Farbstoffen, wie Hämalaun-Eosin oder Giemsa, die normalerweise für Schnitte bzw. Ausstriche herangezogen werden, kann die Feulgen-Kernfärbung vor der autoradiographischen Behandlung der Präparate durchgeführt werden. Das ist als großer Vorteil anzusehen, da auf diese Weise eine problematische Färbung durch die 30 µ dicke Emulsion vermieden wird.

Bei der Feulgen-Färbung werden die Präparate zunächst einer sauren Hydrolyse unterworfen, wodurch aus dem Verband der Thymonukleinsäure Guanin und Adenin abgespalten werden. Die verbleibende Thyminsäure bekommt dadurch freie Aldehydgruppen und bleibt, an Eiweiß gebunden, im Zellkern zurück. Bringt man die so "aufgeschlossenen" Präparate nun in fuchsin-schweflige Säure (Schiff'sches Reagens), verbinden sich die Aldehydgruppen mit dem Reagens zu einem intensiv rot-violetten Farbstoff. Die Reaktion findet nur dort statt, wo die Thyminsäure sitzt, also im Kern. Es handelt sich um eine selektive Kernfärbung.

Vor Beginn der Färbung müssen Schiff'sches Reagens und die später benötigte Spülflüssigkeit hergestellt werden.

a) Schiff'sches Reagens

Es werden 0,5 g Pararosanilin in 15 ml 1nHCl und 0,5 g Kaliummetabisulfit in 85 ml Aqua destillata gelöst und vermischt. Nach 24 Stunden werden 0,3 g Aktivkohle zugesetzt. Nach zweiminütigem Schütteln wird filtriert, die Lösung wird wasserklar. Im Kühlschrank ist die Farblösung in verschlossener Flasche längere Zeit haltbar.

b) Spülflüssigkeit

Zu 10 ml 1n HCl werden 0,5 g Kaliummetabisulfit hinzugefügt. Lösung in 180 ml Leitungswasser. Die Spülflüssigkeit muß immer frisch hergestellt werden.

Die eigentliche Färbung geht nach folgendem Schema vor sich:

- Spülen in Aqua destillata 20 min
- Hydrolisierung in 1n HCl bei 60°C (Tem-

peraturkontrolle, Spielraum 59 - 61°C),
und zwar

12 min bei den Methanol-fixierten Ausstrichen
14 min bei den Formol-fixierten Schnitten

- Einstellen der Präparate in Schiff'sches
Reagens 1,5 Std. lang
- Waschen in Spülflüssigkeit 3 x 10 min (Wechseln)
- Spülen in Leitungswasser 5 - 10 min
- Trocknen der Präparate

4. Exposition der Präparate in flüssiger Emulsion

Zur Beschichtung der Präparate wurde die Filmemulsion Ilford G 5 (Ilford, Essex, England) verwendet. Diese Emulsion ist einige Wochen haltbar und muß während dieser Zeit originalverpackt und lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt werden. Das Auftragen auf die Präparate muß in strengem Dunkelkammerlicht vorgenommen werden.

Die Emulsion, die bei Raumtemperatur feste Gele bildet, wird in einem Wasserbad (Aqua destillata) von 47°C geschmolzen. Für die Doppelmarkierung ist eine weitere Verdünnung ungeeignet, da die etwa 30/μ dick auftragbare Emulsion zur Trennung der 3H- von den 14C-markierten Zellen notwendig ist. Die Emulsion wird gleichmäßig auf die Präparate aufgetragen. Die Objektträger werden in exakt waagrechter Lagerung im Exsikkator getrocknet und anschließend im Expositionskasten, der Blaugel zur weiteren Trocknung enthält, exponiert. Für unsere Präparate erwies sich eine Expositionsdauer von 17 Tagen als geeignet.

5. Weitere fototechnische Behandlung der Präparate

a) Entwicklung

6 min bei 18°C in 4,5 g Amidol + 18 g
 Na_2SO_3 + 12,5 ml KBr ad 1000 ml Aqua dest.

b) Saures Fixierbad

30 min in 300 g Na-thiosulfat + 30 g
Kaliummetabisulfit ad 1000 ml Aqua dest.

c) Neutrales Fixierbad

45 min in 300 g Na-thiosulfat ad 1000 ml
Aqua dest.

d) Waschen in fließendem Leitungswasser

1 Stunde lang

e) Trocknen 24 Std.

Anschließend werden die Präparate mittels Kanadabalsam mit sehr dünnen Deckgläsern eingedeckelt. Danach können sie ausgewertet werden.

IV. Theoretische Grundlagen zur Berechnung der DNS-Synthesedauer nach der Doppelmarkierungsmethode

Bei der Markierung der Lymphknotenzellen mit radioaktivem Thymidin handelt es sich um eine selektive Markierung der DNS. Nur Zellen, die sich zu irgendeinem Zeitpunkt während der Markierung in der DNS-Synthesephase befinden, können aus exogene Thymidin einbauen. Wie bereits angegeben, geht die Markierung bei dieser Methode in zwei Abschnitten vor sich. Die Zeitspanne vom Beginn der Markierung mit ^3H -Thymidin bis zum Beginn der Markierung mit ^{14}C -

Thymidin, die bei uns 40 Minuten beträgt, wird Δt_1 genannt. Die Zellen, die sich während Δt_1 in der DNS-Synthesephase (S) aufhalten und diese Phase noch vor Beginn der ^{14}C -Markierung verlassen, können nur ^3H -markiert werden. Zellen, die ^3H -markiert wurden, aber über den Beginn der ^{14}C -Markierung hinaus in der S-Phase verbleiben, werden zusätzlich ^{14}C -markiert. Eine dritte Gruppe von Zellen schließlich, die während des Markierungsabschnittes mit ^{14}C -Thymidin in die S-Phase eintreten, können nur ^{14}C -markiert werden. Aus diesen Unterschieden der Markierung kann man Beziehungen zur Bestimmung der Dauer der S-Phase ableiten, sofern einige Bedingungen erfüllt sind 27, 62, 63, 81, 82.

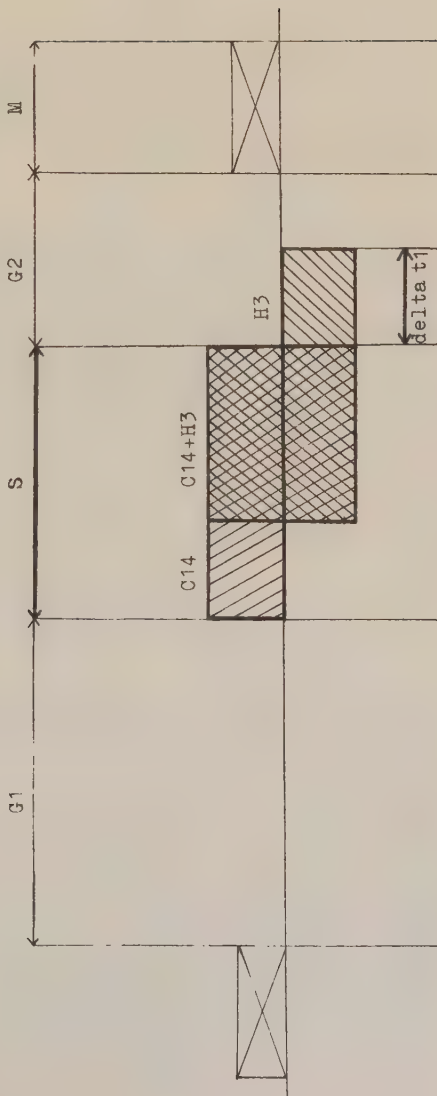
Die Zellpopulation, die untersucht wird, muß im "Steady State" sein, d.h., die Größe der Population bleibt während der Dauer der Untersuchung konstant. Es muß eine asynchrone Proliferation vorliegen, bei der die einzelnen Zellen gleichmäßig über die Zyklusphasen verteilt sind. Die Dauer einer Teilphase des Zyklus ist dann proportional der Anzahl der Zellen in dieser Teilphase.

Mit autoradiographischen Mitteln lassen sich bei dieser Methode zwei Populationen markierter Zellen unterscheiden, Zellen, die nur ^3H -markiert sind und solche, die entweder ^{14}C - oder $^{14}\text{C} + ^3\text{H}$ -markiert sind. Eine Trennung der letzteren ist zur Berechnung der S-Zeit nicht notwendig. Die Zahl der Zellen, die eine ^3H -Markierung zeigen und während Δt_1 aus der S-Phase austreten, ist proportional Δt_1 . Die Gesamtzahl der Zellen, die ^{14}C -markiert werden, allein oder zusätzlich mit Tritium, repräsentiert die Zahl der Zellen, die sich während der ^{14}C -Markierung in der S-Phase befanden, sie ist

Skizze II: Bestimmung der DNS-Synthesedauer nach der Doppelmarkierungsmethode
(nach PILGRIM ⁶³)

Erläuterungen siehe Text

 = nur ³H-markiert
 = ¹⁴C- oder ¹⁴C+
³H-markiert



proportional der Dauer der S-Phase. Das Prinzip der Bestimmung der S-Phase ist in Skizze 2 veranschaulicht ⁶³.

Setzt man die beiden Proportionalitäten zueinander in Beziehung, so erhält man folgende Gleichung, aus der man sehr einfach die Dauer der S-Phase ableiten kann ^{27, 62, 81}:

$$\frac{C\ 14}{S} = \frac{H\ 3}{\Delta t_1} ;$$

daraus

$$S = \frac{C\ 14 \times \Delta t_1}{H\ 3} ;$$

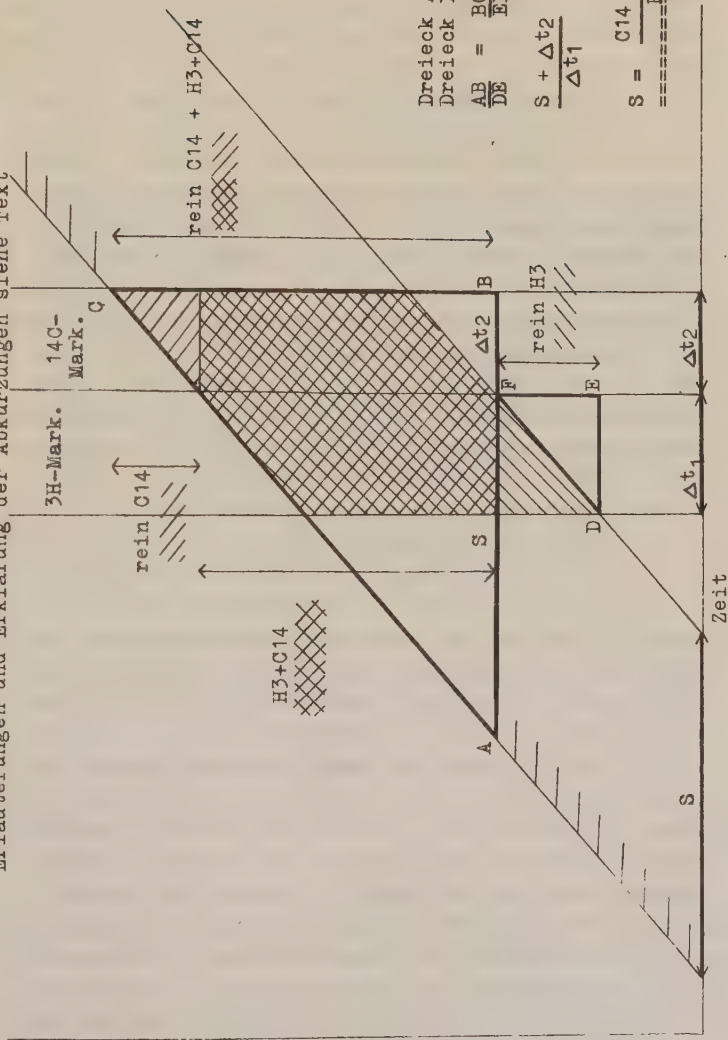
wobei

- S = Dauer der DNS-Synthesephase in Stunden
- C14 = Zahl der 14C- und 14C-+3H-markierten Zellen
- H3 = Zahl der rein 3H-markierten Zellen
- Δt_1 = Zeit zwischen Beginn der 3H- und Beginn der 14C-Markierung

Skizze 3 zeigt ein Diagramm das uns erlaubt, die Gleichung zur Berechnung der S-Dauer aus zwei ähnlichen Dreiecken abzuleiten. Es wird das Modell einer Zellpopulation angenommen, von deren Zellen jede um den gleichen zeitlichen Abstand verschoben in die S-Phase eintritt und nach gleichmäßigem Durchlauf wieder austritt. Das injizierte 3H-Thymidin markiert Zellen, die während dieser ersten Markierungsphase ihre S-Phase beenden, Zellen, die sich auch nachher noch in der S-Phase befinden, und Zellen, die erst während der ersten Markierung in die S-Phase eintreten. Das daraufhin injizierte 14C-Thymidin markiert Zellen, die erst während der zweiten Markierung in die S-Phase gelangen, Zellen, die während dieser

Skizze III: Bestimmung der S-Zeit aus H^3 , $C14$, Δt_1 und Δt_2 , den Katheten zweier ähnlicher rechtwinkliger Dreiecke (Doppelmarkierungsmethode)

Erläuterungen und Erklärung, der Abkürzungen siehe Text



Zellen

Dreieck ABC ähnlich
Dreieck DEF

$$\frac{AB}{DE} = \frac{BC}{EF}$$

$$\frac{S + \Delta t_2}{\Delta t_1} = \frac{C14}{H3}$$

$$S = \frac{C14 + \Delta t1}{H3} - \Delta t2;$$

Markierung ihre S-Phase beenden und Zellen, die schon ^3H -markiert sind und auch noch nach der ^{14}C -Markierung in der S-Phase sind. Zur Bestimmung der S-Phase werden wieder die Zellen, die rein ^{14}C - mit den Zellen, die ^{14}C - + ^3H -markiert sind, als eine Gruppe und die Zellen, die rein ^3H -markiert sind, als andere Gruppe verwendet. Diese beiden Gruppen bilden entsprechende Schenkel in zwei ähnlichen Dreiecken des Diagramms. Die beiden anderen entsprechenden Schenkel stellen Zeitabschnitte dar, und zwar einmal $S + \Delta t_2$ (Δt_2 ist die Zeit zwischen Beginn der ^{14}C -Markierung und Beginn der Fixierung), zum anderen Δt_1 . Die Voraussetzungen für die Gültigkeit der Gleichung, die man aus diesen entsprechenden Schenkeln ähnlicher Dreiecke aufstellen kann, sind dieselben, die für die obige Formel geschildert wurden. Die Gleichung lautet:

$$S = \frac{G_{14} \times \Delta t_1}{H_3} - \Delta t_2 ;$$

wobei die weiter oben gegebenen Erklärungen der Abkürzungen gelten. Die Zeitspanne Δt_2 betrug bei unseren Versuchen jeweils 30 Minuten.

Im Vergleich zur ersten Gleichung würden die Ergebnisse, vor allem, wenn sie untereinander um mehrere Stunden schwanken und hohe Werte wie unsere S-Zeiten erreichen, nur unwesentlich verändert werden. Außerdem muß man die Frage stellen, ob die geringgradige Erhöhung der Genauigkeit, die dadurch erzielt wird, sinnvoll ist. Es ist zu bedenken, daß die Exaktheit der Ergebnisse durch eine Reihe von Faktoren, die teils im Wesen der Methode liegen, teils von der Durchführung der Versuche abhängen, beeinträchtigt werden kann. Es kann jedoch kein Zweifel daran bestehen, daß die erweiterte Formel mathematisch exakt ist.

V. Auswertung und Ergebnisse

1) Kriterien zur Auswertung der Präparate

Bei der Auswertung der Autoradiogramme kam es darauf an, die rein ^3H -markierten von allen ^{14}C -markierten Zellen zu trennen. Die verschiedenen maximalen und mittleren Energien und damit die verschiedenen Reichweiten der beiden β -Strahler liefern uns dafür die Kriterien. Die energiearmen ^3H - β -Teilchen erzeugen aufgrund ihrer geringen Reichweite in der etwa 30μ dicken Emulsion Silberkörner, die zum größten Teil ca. $1 - 2\mu$ über der Zellkernebene liegen und in der horizontalen Ausdehnung die Zellkerngrenzen kaum überschreiten. Die wesentlich energiereicheren ^{14}C - β -Teilchen verursachen dagegen Bahnsuren aus mehreren Silberkörnern, die sowohl seitlich weit über den Zellkern hinaus als auch in die höheren Ebenen der Emulsion reichen (siehe Abb. 2 - 3).

Bei den von uns gewählten Verhältnis zwischen den Markierungssubstanzen ergibt sich ein weiterer Anhaltspunkt zur Unterscheidung der Markierungen. Der größte Teil der markierten Zellen war während des ganzen Markierungsvorganges in der S-Phase, diese Zellen sind ^3H - + ^{14}C -markiert, die Dichte der Silberkörner über der Kernoberfläche dieser Zellen ist groß. Die rein ^3H - bzw. rein ^{14}C -markierten Zellen stehen am Ende bzw. Anfang der S-Phase. Abgesehen davon, daß diese Zellen nur für einen viel kürzeren Zeitraum zum Einbau des markierten Thymidins verfügbar sind, findet der Einbau zu Beginn und am Ende der S-Phase nur an begrenzten Stellen eines Teils der Chromosomen statt, wie CAVE⁸ an Leukozyten feststellte. Die Markierung

Tabelle IV

Patient	A U S S T R I C H E		S C H N I T T E		Ausstriche + Schnitte zusammen	
	C14 ⁺	H3 ⁺⁺	C14 ⁺	H3 ⁺⁺	C14 ⁺	H3 ⁺⁺
	S ₊ (Std)		S ₊ (Std)		S ₊ (Std)	
R.A.	967	33	974	26	1941	59
G.Au.	---	--	412	14	412	14
S.A.	725	25	973	27	1698	52
F.T.	689	11	981	19	1670	30
L.W.	890	24	845	23	1735	47
G.Au.	984	16	714	10	1698	26
K.F.	800	14	---	--	800	14
B.P.	731	19	977	23	1708	42

C14⁺ = Zellen, die 14C- oder 14C-+3H-markiert sind

H3⁺⁺ = Zellen, die nur 3H-markiert sind

S⁺⁺⁺ = Dauer der DNS-Synthesezeit in Stunden

verläuft während dieser Zeit also schwächer als im Mittelteil der S-Phase. Die rein 3H- bzw. die rein 14C-markierten Zellen haben deshalb eine weit geringere Silberkornzahl als die doppelmarkierten Zellen.

Die Auswertung der Präparate wurde durch den Nulleffekt, der im übrigen nicht über allen Präparaten gleich war, nicht behindert. 3H-markierte Zellen mußten mindestens 10 Silberkörner über der Zellkernebene aufweisen, von denen maximal 5 in einer Reihe von höchstens 3μ Länge liegen durften. Trat bei einer markierten Zelle eine Spur mit mehr als 5 Silberkörnern auf oder erstreckte sich eine Spur über mehr als 3μ , so wurde die Zelle als 14C-markiert gewertet. Pro Präparat wurden 400 bis 1000 markierte Zellen differenziert.

2) Ergebnisse der Auswertung

Die Ergebnisse dieser Auswertung an Schnitten und Ausstrichen der 8 Patienten zeigt die Tabelle IV. Die angegebenen S-Zeiten sind nach der ersten der beiden Gleichungen berechnet. Berücksichtigt man die Zeitspanne Δt_2 , wie es in Gleichung II geschieht, erniedrigen sich die Werte um eine halbe Stunde. Aus den Schnitten ergab sich ein mittlerer Wert von 29,1 Stunden (19,6 - 47,6 Stunden), aus den Ausstrichen ein solcher von 30,0 Stunden. Beim Vergleich der Mittelwerte fanden wir keine signifikanten Differenzen, sodaß wir die Schnitte und Ausstriche jedes Patienten zu einem Gesamtergebnis zusammenfaßten (siehe Tabelle IV). Auf diese Weise rechneten wir für die Dauer der DNS-Synthesephase bei proliferierenden leukämischen Lymphknotenzellen an 8 Patienten einen Mittelwert von 29,2 Stunden aus (19,6 - 43,5 Stunden).

VI. Diskussion

A) Lokale Anwendung der Doppelmarkierungsmethode in vivo bei leukämischen Lymphknoten

1) Voraussetzungen

Bei Untersuchungen des Zellwachstums mit der Doppelmarkierungsmethode wird ein Steady State der untersuchten Population vorausgesetzt, d.h., ein Zustand des "Fließgleichgewichtes", bei dem trotz Zustrom und Abstrom von Zellen die durchschnittliche Größe der Population konstant bleibt. Die Proliferation der Tumoren verläuft im allgemeinen nach einem anderen Mechanismus, Tumorzellen zeigen ein exponentielles Wachstum. Dabei steigt die Größe der Population mehr oder weniger schnell an. Auch menschliche Leukämiezellen sind Tumorzellen, sie häufen sich im Lauf der Zeit an. Man kann sie jedoch nicht zu den Zellsystemen rechnen, die durch schnell expandierendes Wachstum gekennzeichnet sind ³⁴. Vor allem bei chronischen Leukämien erfolgt die Expansion im Verlauf längerer Zeiträume. Bei Untersuchungen, die nur kurze Zeit erfordern, kommt für die Dauer dieser Zeitspanne das tatsächliche Wachstum z.B. der Lymphknotenzellen bei chronischer Lymphadenose dem Steady State näher als dem exponentiellen Wachstum. Die Anwendung der Doppelmarkierungsmethode ist deshalb gerechtfertigt.

2) Vorteile

Die Methode der lokalen Doppelmarkierung erlaubt es uns, z.B. im Gegensatz zur Markierten-Mitosen-Methode, bei der mehrere Probeentnahmen erforderlich

sind, durch einen einmaligen Eingriff das zu untersuchende Gewebe zu markieren und anschließend zu exzidieren. Diese eine Materialentnahme reicht aus, mit dem gewonnenen Gewebe die DNS-Synthesedauer und andere Daten der Zellproliferation zu bestimmen. Die Doppelmarkierungsmethode hat einen weiteren Vorteil gegenüber der Markierten-Mitosen-Methode. Während diese Methode nur genaue Ergebnisse liefert, wenn keine größeren Schwankungen in der Dauer der postsynthetisch-prämitotischen Phase G2 auftreten ⁶³, ist die Doppelmarkierungsmethode ohne diesen Vorbehalt anwendbar.

Die lokale Markierung der Lymphknoten ist gegenüber einer intravenösen Applikation des Markierungstoffes vorzuziehen, da wesentlich geringere Mengen des Isotops benötigt werden. Dadurch wird die Aktivität, mit der der Gesamtorganismus belastet wird, äußerst gering gehalten. Für Untersuchungen intravenös markierter Gewebe werden beim Menschen normalerweise 0,1 $\mu\text{C/g}$ Gewicht injiziert ^{32, 39, 75}. Wir belasten den Körper mit insgesamt 16 μC , bei einem angenommenen Gewicht von 60 kg also nur 0,00027 $\mu\text{C/g}$. Die Belastung wird noch dadurch verringert, daß ein Teil der Aktivität nach kurzer Zeit in die Zellen des Lymphknotens eingebaut wird, der ja entfernt wird. Trotz der geringen Gesamtaktivität werden die Lymphknoten gut mit Markierungssubstanz versorgt, da die Injektion dort erfolgt, wo die Markierung vor sich gehen soll.

B) Der Einbau markierten Thymidins in Lymphknoten-
zellen bei chronischer Lymphadenose

1) Markierungsindex

TREMPER ⁷⁷ stellte nach in vitro 3H-Thymidin-

Markierung von cervikalen Lymphknotenpartikeln bei Erkrankungen des lymphatischen Systems fest, daß bei der chronischen Lymphadenose der Anteil synthese-fähiger Zellen im Lymphknoten 4 % ausmacht. Zum Vergleich sei ein Wert angegeben, den KUPER³⁷ für leukämische Blutzellen bei Patienten mit chronischer Lymphadenose ermittelte. Er fand bei ihnen denselben Markierungsindex, den er zuvor für Lymphozyten aus dem Blut Gesunder erhalten hatte, nämlich 0 - 0,4 %. Möglicherweise ist neben den verschiedenen Untersuchungsmaterialien der beiden Autoren auch ein methodischer Unterschied für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich.

Einen Eindruck von der Markierungsdichte der von uns untersuchten Lymphknoten gibt Abb. 1.

2) Morphologische Differenzierung der markierten Zellen.

In der im vorigen Abschnitt erwähnten Untersuchung⁷⁷ wurden in den pathologischen Lymphknoten verschiedene Zellen differenziert. Es wurde beobachtet, daß der Thymidineinbau in die von der chronischen Lymphadenose befallenen Lymphknoten überwiegend in untypische Lymphatische Retikulumzellen, daneben in geringerem Ausmaß in große differenzierte Retikulumzellen und Lymphoblasten erfolgte.

Bei unseren Versuchen fertigten wir zunächst von jedem Lymphknoten Testpräparate mit Giemsa-Färbung (Ausstriche) und Hämalaun-Eosin-Färbung (Schnitte) an. Bei allen Präparaten bot sich ein überwiegend einheitliches Zellbild. Es handelte sich durchweg um lymphozytenähnliche Zellen, bei denen zwar Kerndurchmesser und Chromatindichte variierten, jedoch eine Einteilung in verschiedene Zellarten zu willkürlich

erschien. Wir verzichteten deshalb auf eine Differenzierung und sprechen einheitlich von "leukämischen Lymphknotenzellen". Allerdings können wir die Beobachtung von TREPEL ⁷⁷ bestätigen, daß der Einbau von markiertem Thymidin vor allem in größere Lymphknotenzellen vor sich geht.

C) Streuungsbreite der Ergebnisse

Unsere Ergebnisse schwanken zwischen 19,5 und 47,6 Stunden. Für diese relativ große Streuungsbreite können verschiedene Faktoren verantwortlich sein.

1) Versuchsbedingungen

Bei allen Versuchen wurde auf die gleichmäßige Durchführung großer Wert gelegt. Die vorgegebenen Zeiten wurden so genau wie möglich eingehalten. Bei jedem Patienten wurden dieselben Aktivitäten von ³H-Thymidin (10 μ C) und ¹⁴C-Thymidin (6 μ C) in einen oberflächlichen inguinalen Lymphknoten injiziert. Es wäre jedoch denkbar, daß die Diffusion der Markierungsstoffe je nach Einstichstelle und Größe der Lymphknoten differiert, und daraus Abweichungen zu erklären sind. Auch mag es bei der Auswertung der Präparate bei einzelnen Zellen nicht ganz leicht gewesen sein, die ³H-Markierung einwandfrei von der ¹⁴C-Markierung zu unterscheiden.

Methodebedingte Faktoren reichen aber bei weitem nicht aus, die nicht unbeträchtlichen Unterschiede zu erklären. Hauptursache scheinen die verschiedenen, nicht genau faßbaren Stadien der Erkrankung bei den einzelnen Patienten zu sein.

2) Stadien der Erkrankung

Alle acht Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung in gutem Allgemeinzustand, keiner war kachektisch oder litt an klinisch manifesten Komplikationen der Lymphadenose. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß sich alle Patienten im gleichen Stadium der Erkrankung befanden. Die peripheren Leukozytenwerte schwankten zwischen 8900 und 201000 pro cmm. Die Anteile der Lymphozyten an den weißen Blutzellen differierten zwischen 57 % und 99 %. Die Krankheitsdauern reichten von drei Monaten bis zu sieben Jahren. Schließlich waren zwei Patienten bis kurz vor der Untersuchung mit Steroiden bzw. Cytostatika und Steroiden behandelt worden. Es ist sehr gut möglich, daß die angesprochenen Faktoren sich in unterschiedlichen S-Zeiten ausdrücken. Es müßte auch noch geklärt werden, ob ein möglicherweise bestehender Unterschied der Ploidiestufen der untersuchten Zellen bei den verschiedenen Patienten für die Abweichungen mitverantwortlich zu machen wäre ⁷¹.

Obwohl die Zahl der von uns untersuchten Patienten im Vergleich zu den von anderen Autoren angegebenen ziemlich hoch ist (siehe Tabelle V b), erlaubt sie es uns nicht, mathematisch ausdrückbare Korrelationen zwischen den voneinander abweichenden S-Zeiten unserer Patienten und den eben geschilderten Parametern des Krankheitsverlaufs herzustellen.

D) Vergleich unserer Ergebnisse mit den Befunden anderer Autoren

1) Vergleichbarkeit in vivo und in vitro gewonnener Befunde

Die Frage, ob in-vitro-Untersuchungen diesel-

Tabelle V a

Literaturangaben über die S-Zeit bei menschlichen Zellen
(in vivo)

Normale Zellen der Hämoopoese

Autor	Anzahl der Fälle	Zellart	S-Zeit (Std)
BOND ⁶ 1959		Knochenmark, Polychromatische Normoblasten	9
KILLMANN ³³ 1964		Knochenmark, Erythrozytenvorläufer Granulozytenvorläufer	9 24
STRYCKLANS ⁺ 1964 ⁷⁴	1	Blut und Knochenmark Erythrozyten- und Granulozytenvorläufer	12
LALA ⁺⁺ 1965 ³⁹	1	Knochenmark, Myelozyten Myeloblasten Erythrozytenvorläufer	6,1 5,7 6,0
STRYCKLANS ⁺ 1966 ⁷⁵	2	Blut und Knochenmark, Erythrozyten- und Granulozytenvorläufer	13 - 14

⁺ = Markierte-Mitosen-Methode

⁺⁺ = Doppelmarkierungsmethode

Tabelle V b

Literaturangaben über die S-Zeit bei menschlichen Zellen
(in vivo)

Pathologische Hämopoesezellen, Krebszellen

Autor	Zahl d.F.	Erkrankung	Zellart	S-Zeit (Std.)
KILMANN 1963 (32)	je 1	CML AML CML	Knochenmark, Leukämie- zellen	7,5 3,3 6,2
MAUER ⁴⁸ 1963	1	AML	Knochenmark, Leukämiezellen	8 - 10
CLARKSON ⁹ 1964 +	1	A L	Knochenmark, Leukämiezellen	20
OTA ⁵⁹ 1964 +	3	AML	Blut, Knochenmark	20
	1	ALL	Leukämiezellen	20
STRYCKMANS + 1964 (74)	je 1	Polycythämie Myel.Metapl.	Knochenmark, Blut; Erythro- zyten- u. Granuloz.-Vorl.	12 12
CLARKSON + 1965 (10) u. OTA + 1964 (59)	je 1	Uterus CA OvarialCA OvarialCA Magen CA Magen CA Lymphosarkom	Krebszellen	60 28 34 20 32 17
LALA ++ 1965 (39)	1	AML	Knochenmark, Myeloblasten Erythrozytenvorläufer	4,7 5,7
STRYCKMANS + 1966 (75)	1 2	Polycythämie Myel.Metapl.	Knochenmark, Blut; Erythro- zyten- u. Granuloz.-Vorl.	13 - 14 13 - 14
CLARKSON + 1967 (11)	je 1	AML A. Myelomono- blasten Leuk.	Knochenmark, Leukämie- zellen	22 19
MALAISE ⁴⁶ 1967		Basaliom	Krebszellen	19
SAUNDERS ⁶⁹ 1967 +	3	A L	Knochenmark, Leukämiezellen	20
KEISER + 1968 (30)	1	Monozytenl. (Nägeli)	Knochenmark, Leukämiezellen	22

+ = Markierte-Mitosen-Methode

++ = Doppelmarkierungsmethode

CML = Chronischen Myeloische Leukämie

AML = Akute Myeloische Leukämie

ALL = Akute Lymphatische Leukämie

A L = Akute Leukämie

ben Ergebnisse liefern wie in vivo durchgeführte, ist bisher nicht einheitlich beantwortet worden. LALA³⁹, der mit einer abgewandelten Doppelmarkierungsmethode unter anderem Knochenmarkszellen des Hundes untersuchte, fand gegenüber einem in-vivo-Wert von 6 Stunden für die S-Zeit einen stark erhöhten in-vitro-Wert von 17 Stunden. DEFENDI¹⁶ dagegen, der lymphoblastische Leukämiezellen der Maus analysierte, ermittelte in vivo und in vitro die gleiche S-Zeit von jeweils 6,9 - 7,4 Stunden. Wir sind der Meinung, daß in-vivo-Untersuchungen schlüssigere Aussagen über die Proliferationsvorgänge von Zellen lebender Organismen erlauben.

In dieser Diskussion sollen nur in vivo gewonnene Ergebnisse von menschlichen Zellen miteinander verglichen werden. Tierische Zellen werden nicht berücksichtigt; eine sehr ausführliche Tabelle über die bisher bekannten S-Zeiten bei verschiedenen normalen und pathologischen Zellsystemen von Tieren ist bei SCHULTZE⁷¹ zu finden.

Da uns keine andere Arbeit zur Verfügung stand, in der Aussagen über die S-Zeit von Lymphknotenzellen bei chronischer Lymphadenose enthalten sind, können wir unsere Ergebnisse nur mit Daten über Knochenmark- und Blutzellen bei anderen Leukämien und einigen anderen Malignomzellen vergleichen (siehe Tabellen Va und Vb).

2) Leukämiezellen des Menschen

Die Angaben über die S-Zeiten von Leukämien lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die Mehrzahl der Autoren^{9, 11, 30, 59, 69} gibt die an insgesamt 11 Fällen von akuter Leukämie ermittelte S-Zeit mit

19 bis 22 Stunden an. Drei weitere Autoren dagegen 32, 39, 48, die über insgesamt 3 akute und 2 chronische Myelosen berichten, ermittelten S-Zeiten zwischen 3,3 und 10 Stunden.

Alle Autoren der ersten Gruppe arbeiteten mit derselben Methode nach vergleichbaren Bedingungen, sie verwendeten die Markierte-Mitosen-Methode. Die Autoren der zweiten Gruppe arbeiteten dagegen nach anderen und verschiedenen Methoden. KILLMANN³² bestimmte die S-Zeit aus den zuvor errechneten Werten für Markierungsindex und Generationszeit und erhielt für 2 Fälle von chronischer Myelose für die Knochenmarkszellen S-Zeiten von 7,5 bzw. 6,2 Stunden, für 1 Fall von akuter Myelose sogar nur 3,3 Stunden. Diese Werte schon von der Methode her als untere Grenzwerte angesehen werden, da zur Ermittlung des Markierungsindex nicht speziell die proliferierende Fraktion der Knochenmarkszellen bestimmt wurde. MAUER⁴⁸ errechnete aus dem zeitlichen Verlauf des Markierungsindex nach einmaliger Markierung mit 3H-Thymidin bei einem fünfjährigen Mädchen mit akuter myeloblastischer Leukämie die S-Zeit der Knochenmarkszellen mit 8 - 10 Stunden. LALA³⁹ schließlich bestimmte die S-Zeit von Knochenmarkszellen bei einer akuten Myelose nach einer modifizierten Doppelmarkierungsmethode, bei der er die 3H-Markierung in vivo, die 14C-Markierung aber in vitro ausführte. Er erhielt für Myeloblasten einen Wert von 4,7 Stunden, für Erythrozytenvorläufer von 5,7 Stunden.

Unsere eigenen Ergebnisse weichen stark von denen der zweiten der eben geschilderten Gruppen ab, kaum jedoch von denen der ersten. Sie stimmen außerdem weitgehend mit den Werten überein, die für andere maligne Zellen des Menschen angegeben werden.

3) Andere Malignomzellen des Menschen

MALAISE ⁴⁶ gibt für das Basalzellenepitheliom des Menschen eine S-Zeit von ca. 19 Stunden an. OTA ⁵⁹ und CLARKSON ¹⁰ ermittelten für Carcinome des Magens S-Zeiten von 20 bzw. 32 Stunden, für Ovarialcarcinome von 28 bzw. 34 Stunden, für ein Lymphosarkom von 17 Stunden und für ein Uteruscarcinom von 60 Stunden. Den sehr hohen Wert von 60 Stunden führen die Autoren selbst auf eine Verlängerung der S-Phase durch die schädigende Wirkung der Tritiumstrahlung zurück. Sie hatten bei dieser Patientin 500 μ C ³H-Thymidin in einen abgekapselten Peritonealerguß von ca. 1 Liter Inhalt mit freien Krebszellen injiziert.

4) Vergleich zwischen normalen und malignen Zellen des Menschen.

LALA ⁵⁵, STRYCKMANS ^{74, 75} und KESSE-ELIAS ³¹, von denen letzterer allerdings in vitro arbeitete, verglichen S-Zeiten normaler Knochenmarkzellen mit solchen hämatologischer Erkrankungen. Während LALA bei normalen und leukämischen Knochenmarkzellen und STRYCKMANS bei normalen Zellen in Blut und Knochenmark und bei Zellen von Patienten mit Polycythämie bzw. Myeloischer Metaplasie keinen Unterschied fanden, kam KESSE-ELIAS beim Vergleich normaler Erythrozytenvorläufer mit solchen bei Thalassemia major auf eine starke Differenz (17,9 bzw. 10,0 Stunden).

Ein Vergleich aller uns aus der Literatur zur Verfügung stehender S-Zeiten von Leukämiezellen und anderen Malignomzellen mit denen normaler Knochenmark- und Blutzellen rechtfertigt unserer Meinung nach die Annahme, daß die DNS-Synthesedauer maligner

Zellen länger ist als die normaler Zellen.

VII. Zusammenfassung

Die Aufklärung der Proliferationsmechanismen normaler und maligner Zellen des Menschen ist ein wichtiger Bereich der Erforschung der neoplastischen Erkrankungen. Zum Studium des Zellwachstums gehört die Untersuchung des Generationszyklus und seiner Teilphasen. Die Phase, in der zur Vorbereitung der Teilung das genetische Material redupliziert wird, nennt man DNS-Synthesephase. Seit der Einführung der Autoradiographie mit ^3H -Thymidin ist es gelungen, die Dauer dieser Phase für eine Reihe von Zellen zu bestimmen. Dazu wurden verschiedene autoradiographische Methoden verwendet, die alle darauf beruhen, daß Tritiumthymidin selektiv in die DNS eingebaut wird, und zwar ausschließlich während der DNS-Synthesephase. Eine dieser Methoden, die sich für Untersuchungen am Menschen besonders eignet, ist die Doppelmarkierungsmethode, die wir lokal an inguinalen Lymphknoten von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie anwandten. Wir injizierten bei einem unter Lokalanästhesie vorgenommenen Eingriff in den jeweils ausgesuchten Lymphknoten $10\text{ }\mu\text{C}$ ^3H -Thymidin und nach einer bestimmten Zeit $6\text{ }\mu\text{C}$ ^{14}C -Thymidin und entfernten anschließend den markierten Lymphknoten. Es wurden dann Ausstriche und Schnitte dieses Lymphknotens hergestellt, mit Feulgen-Kernfärbung gefärbt und mit flüssiger Filmemulsion beschichtet. Nach 17-tägiger Exposition wurden die Autoradiogramme entwickelt und mikroskopisch ausgewertet. Zur Bestimmung der S-Zeit war es notwendig, zwei Gruppen markierter Zellen zu unterscheiden, einmal die der rein ^3H -markierten und zum anderen die der ^{14}C - bzw. ^{14}C - + ^3H -markierten Zellen. Aus dem Verhältnis dieser beiden Gruppen und aus der Zeit zwischen Beginn der ersten und zwei-

ten Markierung wurden dann für Schnitte und Ausstriche befallener Lymphknoten von acht Patienten mit chronischer Lymphadenose die DNS-Synthesezeiten der leukämischen Lymphknotenzellen berechnet.

Sie schwankten bei den einzelnen Patienten zwischen 19,6 und 47,6 Stunden bei den Schnitten und zwischen 19,5 und 41,8 Stunden bei den Ausstrichen. Beim Vergleich der Mittelwerte von Schnitten und Ausstrichen fanden wir keine signifikanten Differenzen, sodaß wir die Ergebnisse von beiden zusammenfaßten. Auf diese Weise ermittelten wir für die Dauer der DNS-Synthesephase bei proliferierenden leukämischen Lymphknotenzellen einen Mittelwert von 29,2 Stunden (19,6 bis 43,5 Stunden). Für die beträchtlichen Abweichungen der Einzelergebnisse untereinander sind hauptsächlich verschiedene Krankheitsstadien der Patienten verantwortlich zu machen.

Unsere Befunde werden mit den bisher bekannten Werten von DNS-Synthesezeiten menschlicher Zellen, die ebenfalls in vivo gewonnen wurden, verglichen.

Es besteht eine gute Übereinstimmung mit einigen Ergebnissen über Leukämiezellen und verschiedene andere maligne Zellen. Aus der Literatur ergibt sich, daß maligne Zellen längere DNS-Synthesedauern haben als normale Zellen. Unsere nächste Aufgabe wird darin bestehen, dies bei Lymphknotenzellen zu untersuchen. Ziel dieser und weiterer Untersuchungen an Lymphknotenzellen ist es, der Beantwortung der Frage näherzukommen, ob die Vermehrung der Lymphozyten im peripheren Blut bei Lymphadenosen Folge einer gesteigerten Proliferation oder einer im Durchschnitt verlängerten Lebensdauer ist.



Abb. 1: Autoradiogramm eines Lymphdrüsenschnittes (Pat.K.F.)
Vergrößerung 25-fach. Das Bild vermittelt einen
Eindruck der Markierungsdichte der von uns unter-
suchten Lymphknoten.

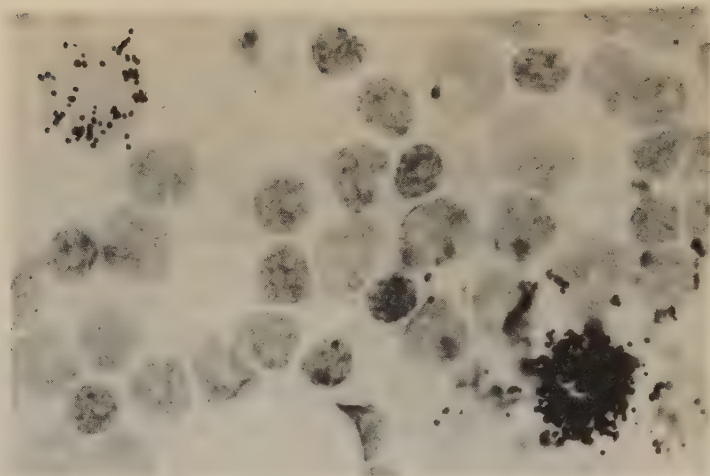


Abb.2: Autoradiogramm eines Lymphdrüsenausstriches (Pat.K.F.) Vergrößerung 400-fach. Einstellung auf Zellkernebene. Darstellung einer ^3H - (links oben) und einer ^{14}C -markierten Zelle.

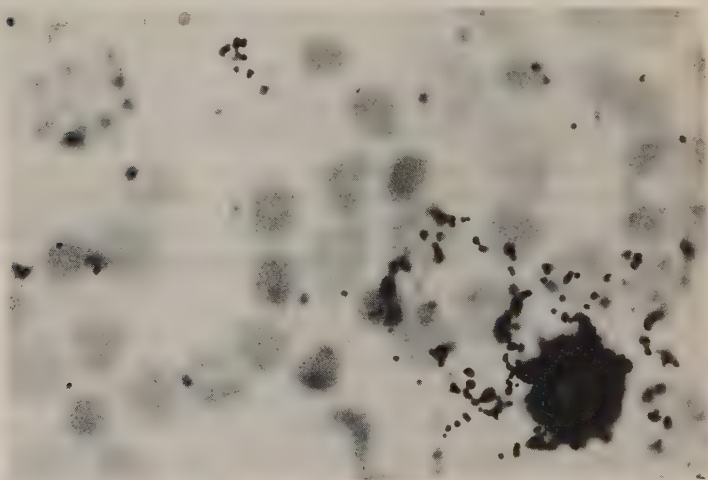


Abb.3: Gleiches Präparat, gleiche Vergrößerung wie Abb.2. Einstellung oberhalb der Zellkernebene. Die ^3H -Markierung wird unscharf, über und um die ^{14}C -markierte Zelle erscheinen neue, scharf eingestellte Silberkörner. Nähere Erläuterung siehe Text Seite 54

Literaturverzeichnis

- 1) BASERGA R., HENEGAR G.C., KISIELESKI W.E. and
LISCO H.: Uptake of Tritiated Thymidine by
Human Tumors in Vivo.
Lab.Invest.: 11, 360 - 364, 1962
- 2) BASERGA R.: Mitotic Cycle of Ascites Tumor Cells.
Arch.Path.: 75, 156 - 161, 1963
- 3) BESSIS M.: Lymphoid Tissue.
In: Electron Microscopic Anatomy. Ed: S.M.Kurz,
Acad.Press, New York, 183 - 198, 1964
- 4) BIERMANN H.R.: The Leukemias - Proliferative or
Accumulative ?
Blood: 30, 238 - 250, 1967
- 5) BOLL I.: Studien zur Proliferationsaktivität des
menschlichen Knochenmarks mittels Einzelzell-
autoradiographien nach Radiophosphorzusatz in
vitro.
Acta haemat. 18, 390 - 403, 1957
- 6) BOND V.P., FLIEDNER T.M., CRONKITE E.P., RUBINI
J.R. and ROBERTSON J.S.: Cell Turnover in
Blood and Blood - Forming Tissues Studied
with Tritiated Thymidine.
In: The Kinetics of Cellular Proliferation,
Ed: F.Stohlman jr., Grune and Stratton,
New York, 188 - 200, 1959
- 7) BRAUNSTEINER H., HÜFER R. und SAILER S.:
Der Lymphozyt.
Dtsch.Med.Wschr.: 15, 721 - 727, 1961
- 8) CAVE M.D.: Reverse Patterns of Thymidine - H3
Incorporation in Human Chromosomes.
Hereditas: 54, 338 - 355, 1966

- 9) CLARKSON B., OTA K., OHKITA T. and O'CONNOR A.:
Cellular Proliferation in Acute Leukemia.
Proc.Amer.Ass.Cancer Res.: 5, 12, 1964
- 10) CLARKSON B., OHKITA T., OTA K. and O'CONNOR A.:
Kinetics of Proliferation of Cancer Cells
in Neoplastic Effusions in Man
Cancer: 18, 1189 - 1213, 1965
- 11) CLARKSON B., OHKITA T., OTA K. and FRIED J.:
Studies of Cellular Proliferation in Human
Leukemia. I. Estimation of Growth Rates of
Leukemic and Normal Hematopoietic Cells in
Two Adults with Acute Leukemia Given Single
Injections of Tritiated Thymidine.
J.Clin.Invest.: 46, 506 - 529, 1967
- 12) CRONKITE E.P.: In: Discussion of Radiation Effects
of Cellular Labels.
In: The Kinetics of Cellular Proliferation.
Ed: F.Stohlman jr., Grune and Stratton, New
York, 137, 1959
- 13) CRONKITE E.P., BOND V.P., FLIEDNER T.M. and RUBINI
J.R.: The Use of Tritiated Thymidine in the
Study of DNA Synthesis and Cell Turnover in
Hemopoietic Tissues.
Lab.Invest.: 8, 263 - 277, 1959
- 14) DAMESHEK W. and GUNZ F.: Leukemia. VI. The
Pathology of the Leukemic Cell. 114 - 165
Grune and Stratton, New York, 1964
- 15) DAMESHEK W.: Chronic Lymphocytic Leukemia - an
Accumulative Disease of Immunologically
Incompetent Lymphocytes.
Blood: 29, 566 - 584, 1967

- 16) DEFENDI V. and MANSON L.A.: Analysis of the Life Cycle in Mammalian Cells.
Nature: 198, 359 - 361, 1963
- 17) DÖRMER P., TULINIUS H. und OEHLERT W.: Untersuchungen über die Generationszeit, DNS-Synthesezeit und Mitosedauer von Zellen der hyperplastischen Epidermis und des Plattenepithelcarcinoms der Maus nach Methylcholanthrenpinselung.
Zeitschr.f.Krebsforsch.: 66, 11 - 28, 1964
- 18) EVERETT N.B., REINHARDT W.O. and YOFFEY J.M.:
The Appearance of Labeled Cells in the Thoracic Duct Lymph of the Guinea Pig after the Administration of Tritiated Thymidine.
Blood: 15, 82 - 94, 1960
- 19) FICQ A: Autoradiography.
In: The Cell. Eds.: J.Brachet and A.E.Mirsky, Vol.I, Chapter 3, 67 - 90, Acad.Press, New York, London, 1959
- 20) GOWANS J.L.: The Transfusion of Lymphocytes in Experimental Animals.
In: The Kinetics of Cellular Proliferation, Ed: F.Stohlman jr., Grune and Stratton, New York, 64 - 68, 1959
- 21) GOWANS J.L. and MCGREGOR D.D.: The Production of Lymphocytes by Lymphoid Tissue.
In: Cell Proliferation. Eds.: L.F.Lamerton and R.J.M.Fry, Blackwell Scient.Publ., Oxford, 113 - 125, 1963
- 22) GREENBERG M.L., CHANANA A.D., CRONKITE E.P., SCHIFFER L.M. and STRYCKMANS F.A.: Tritiated Thymidine as a Cytocidal Agent in Human Leukemia.
Blood: 28, 851 - 859, 1966

- 23) GRUNDMANN E.: Neuere Befunde über Entstehung und Bedeutung der Lymphozyten.
Dtsch.Med.Wschr.: 85, 17, 741 - 746, 1960
- 24) HAMILTON L.D.: Metabolic Stability of RNA and DNA in Human Leukemic Leukocytes; the Function of Lymphocytes.
In: The Leukemias. Etiology, Pathophysiology and Treatment. Ed: J.Rebuck, Academic Press, New York, 381 - 400, 1957
- 25) HAMILTON L.D.: Carbon-14 Labeling of DNA in Studying Haematopoietic Cells.
In: The Kinetics of Cellular Proliferation. Ed: F.Stohlman jr., Grune and Stratton, New York, 151 - 165, 1959
- 26) HAMILTON L.D.: Control of Lymphocyte Production.
In: Homeostatic Mechanisms. Brookhaven Symp. in Biol.: 10, 52 - 74, 1959
- 27) HILSCHER W., MAURER W.: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und ihres zeitlichen Verlaufs bei Spermatogonien der Ratte durch Doppelmarkierung mit C14- und H3- Thymidin.
Nat.wiss.: 49, 352, 1962
- 28) HOLUB M.: The Nature of the Activated Small Lymphocyte.
In: The Lymphocyte in Immunology and Hemopoiesis. Ed: J.M.Yoffey. Verlag E.Arnold, London, 1967
- 29) HOWARD A. and PELC S.R.: Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and its Relation to Chromosome Breakage.
Heredity 6, 261 - 273, 1953

- 30) KEISER G.: Cytokinetic Studies in a Monocytic Leukemia.
In: Second Meeting of the European Study Group for Cell Proliferation, Schloß Reinsburg, Deutschland, Okt. 1968
- 31) KESSE-ELIAS M., HARRISS E.B. and GYFTAKI E.:
In vitro Study of DNA-Synthesis Time and Cell-Cycle Time in Erythrocyte Precursors of Normal and Thalassaemic Subjects, Using a ^3H - and ^{14}C - Thymidine Double Labelling Technique.
Acat haematol.: 38, 170 - 177, 1967
- 32) KILLMANN S.A., CRONKITE E.P., ROBERTSON J.S., FLIEDNER T.M. and BOND V.P.: Estimation of Phases of the Life Cycle of Leukemic Cells from Labeling in Human Beings in Vivo with Tritiated Thymidine.
Lab.Invest.: 12, 671 - 684, 1963
- 33) KILLMANN S.A., CRONKITE E.P., FLIEDNER T.M. and BOND V.P.: Mitotic Indices of Human Bone Marrow Cells. III. Duration of some Phases of Erythrocytic and Granulocytic Proliferation Computed from Mitotic Indices.
Blood: 24, 267 - 280, 1964
- 34) KILLMANN S.A.: Acute Leukemia: The Kinetics of Leukemic Blast Cells in Man.
Ser.Haemat. I 3, 38 - 102, 1968
- 35) KCBURG E. und SCHULTZE B.: Autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Thymidin über die Dauer der DNS-Synthese, der Ruhephase und der Mitose bei proliferierenden Systemen wie den Epithelien des Darms, des Oesophagus und der Cornea der Maus.
Verh.dt.Ges.Path.: 45, 103 - 107, 1961

- 36) KOBURG E. und MAURER W.: Autoradiographische Untersuchung über die Dauer der DNS-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithellen und anderen Zelltypen der Maus. Biochim.Biophys.Acta: 61, 229 - 242, 1962
- 37) KUPER S.W.A. and BIGNALL J.R.: Tritiated-Thymidine Uptake by Tumour Cells in Blood. The Lancet, Juni 1964, 1412 - 1414
- 38) LAJTHA L.G.: The Use of Radiation in Studies of Cell Proliferation. In: Cell Proliferation. Eds: L.F.Lamerton and R.J.M.Fry, Blackwell Scient.Publ., Oxford, 80 - 91, 1963
- 39) LALA P.K., MALONEY M.A. and PATT H.M.: Measurement of DNA-Synthesis Time in Myeloid-Erythroid Precursors. Exp.Cell Res.: 38, 626 - 634
- 40) LAWLER S.D.: Chromosomal Aberrations in Haematological Disorders. In: XII. Congress Intern.Soc.Hematol., New York, 40 - 47, 1968
- 41) LEIBER B.: Der menschliche Lymphknoten. Urban und Schwarzenberg, München, 1961
- 42) LENNARTZ K.J. und MAURER W.: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und der Generationszeit beim Ehrlich-Ascites-Tumor der Maus durch Doppelmarkierung mit ^{14}C - und ^3H -Thymidin. Zeitschr.f.Zellforsch.: 63, 478 - 495, 1964
- 43) LENNERT K.: Lymphknoten, Cytologie und Lymphadenitis. In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Hsgeb.: F.Uehlinger, Band I, 3.Teil, A., Springer Verlag, Berlin, 1961

- 44) LENNERT K.: Pathologie der Halslymphknoten.
Springer Verlag, Berlin, 1964
- 45) LITTLE J.R., BRECHER T.R. and ROSE S.:
Determination of Lymphocyte Turnover by
Continuous Infusion of ^3H -Thymidine.
Blood 19, 236 - 242, 1962
- 46) MALAISE E., FRINDEL E. et TUBIANA M.: Cinétique
de la prolifération cellulaire de deux
tumeurs humaines étudiées grace à l'injection
de thymidine tritiée.
C.R.Acad.Sci. (Paris) 264, 1104 - 1106, 1967
- 47) MALONEY M.A., PATT H.M. and WEBER C.L.: Estimation
of Deoxyribonucleic Acid Synthetic Period for
Myelocytes in Dog Bone Marrow.
Nature 193, 134 - 135, 1962
- 48) MAUER A.M. and FISHER V.: In Vivo Study of Cell
Kinetics in Acute Leukemia.
Nature: 197, 574 - 576, 1963
- 49) MAUER A.M. and FISHER V.: Characteristics of Cell
Proliferation in Four Patients with Untreated
Leukemia.
Blood, 28, 428 - 445, 1966
- 50) MAURER W.: Neuere Methoden und Ergebnisse der Auto-
radiographie.
In: Sec.Int.Congr.Histo-andCytochem., Frank-
furt, Springer 1964
- 51) MENDELSON M.L.: Cell Proliferation and Tumor
Growth.
In: Cell Proliferation. Eds.: L.F.Lamerton
and R.J.L.Fry, Blackwell Scient.Publ,
Oxford, 190 - 210, 1963

- 52) MENDELSON M.L., DOHAN F.C. and MCORE H.A.:
Autoradiographic Analysis of Cell Prolifera-
tion in Spontaneous Breast Cancer of C3H
Mouse. I. Typical Cell Cycle and Timing of
DNA Synthesis.
J.Nat.Cancer Inst.: 25, 477 - 484, 1960
- 53) METCALF D.: Lymphocyte Kinetics in the Thymus.
In: The Lymphocyte in Immunology and Hemo-
poiesis. Ed: J.M.Yoffey, Verlag E.Arnold,
London, 333 - 341, 1967
- 54) MILTON J.D. et COOPER E.H. et HALLE-PANNENKO O.:
La dégradation de la thymidine par les
lymphocytes transformés.
Rev.Franc.Etudes Clin.et Biol.: X, 419 - 422, 1965
- 55) NORMAN A. and SASAKI M.S., OTTOMAN R.E. and
FINGERHUT A.G.: Lymphocyte Lifetime in Women.
Science: 147, 745, 1965
- 56) OHKITA T.: Kinetics of Cellular Proliferation in
Leukemia and Cancer.
Acta Haemat.Jap.: 27, 693 - 704, 1964
- 57) OSGOOD E.E., TIVEY H., DAVISON K.B., SEAMAN A.J.
and LI J.G.: The Relative Rates of Formation
of New Leukocytes in Patients with Acute and
Chronic Leukemias.
Cancer: 5, 331 - 335, 1952
- 58) OSGOOD E.E., SEAMAN A.J., TIVEY H. and RIGAS D.A.:
Duration of Life and of the Different Stages
of Maturation of Normal and Leukemic Leukocytes.
Rev.Hemat.: 9, 543 - 554, 1954
- 59) Ota K.: Kinetics of Cellular Proliferation in
Leukemia and Cancer.
Acta Haemat.Jap.: 27, 693 - 704, 1964

- 60) OTTESEN J.: On the Age of Human White Cells in Peripheral Blood.
Acta physiol.scand.: 32, 75 - 93, 1954
- 61) PERRY S., IRVIN G.L.III and WHANG J.: Studies of Lymphocyte Kinetics in Man.
In: The Lymphocyte in Immunology and Hemopoiesis. Ed: J.M.Yoffey, Verlag E.Arnold, London, 1967, 99 - 107
- 62) PILGRIM C. und MAURER W.: Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdopplungszeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei Doppelmarkierung mit ³H- und ¹⁴C-Thymidin.
Nat.wiss.: 49, 544 - 545, 1962
- 63) PILGRIM C. und MAURER W.: Autoradiographische Untersuchung über die Konstanz der DNS-Verdopplungsdauer bei Zellarten von Maus und Ratte durch Doppelmarkierung mit ³H- und ¹⁴C-Thymidin.
Exp.Cell Res.: 37, 183 - 199, 1965
- 64) QUASTLER H.: The Analysis of Cell Population Kinetics.
In: Cell Proliferation. Eds.: L.F.Lamerton and R.J.M.Fry, Blackwell Scient.Publ., Oxford, 18 - 34, 1963
- 65) QUASTLER H. and SHERMAN F.G.: Cell Population Kinetics in the Intestinal Epithelium of the Mouse.
Exp.Cell Res.: 17, 420 - 438, 1959
- 66) ROBINSON S.H., BRÄCHER G., LOURIE I.S. and HALEY J.E.: Leukocyte Labeling in Rats during and after Continuous Infusion of Tritiated Thymidine: Implications for Lymphocyte Longevity and DNA Reutilization.
Blood, 26, 281 - 295, 1965

- 67) RUBINI J.R., CRONKITE E.P., BOND V.P. and
FLIEDNER T.M.: The Metabolism and Fate of
Tritiated Thymidine in Man.
J.Clin.Invest.: 39, 909 - 918, 1960
- 68) RUTHMANN A.: Methoden der Zellforschung.
Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart, 1966
- 69) SAUNDERS E.F., LAMPKIN B.C. and MAUER A.M.:
Variation of Proliferative Activity in
Leukemic Cell Populations of Patients with
Acute Leukemia.
J.Clin.Invest.: 46, 1356 - 1363, 1967
- 70) SCHIFFER L.M.: Kinetics of Chronic Lymphocytic
Leukemia.
Ser.Hemat.: I 3, 3 - 23, 1968
- 71) SCHULTZE B.: Die Orthologie und Pathologie des
Nukleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der
Zelle im Autoradiogramm.
In: Handbuch der Allgemeinen Pathologie ,
Band II: Die Zelle, Teil 5: Stoffwechsel und
Feinstruktur der Zelle, redig.v. F.Büchner,
Springer Verlag, Berlin, 466 - 670, 1968
- 72) SCHULTZE B., OEHLERT W.: Autoradiographic
Investigation of Incorporation of H³-Thymidine
into Cells of the Rat and Mouse.
Science: 131, 737 - 738, 1960
- 73) SHERMAN F.G., QUASTLER H. and WIMBER D.R.: Cell
Population Kinetics in the Ear Epidermis of
Mice.
Exp.Cell Res.: 25, 114 - 119, 1961
- 74) STRYCKMANS P., RAMOS J., FLIEDNER T.M. and
CRONKITE E.P.: An Estimate of DNA Synthesis
Time in White and Red Cell Precursors in
Human Beings.
Blood: 24, 851, 1964

- 75) STRICKMANS P., CRONKITE E.P., FACHE J.,
FLIEDNER T.H. and RALOS J.: Deoxyribonucleic
Acid Synthesis Time of Erythropoietic and
Granulopoietic Cells in Human Beings.
Nature: 211, 717 - 720, 1966
- 76) TONNA E.A. and CRONKITE E.P.: An Autoradiographic
Study of Periosteal Cell Proliferation with
Tritiated Thymidine.
Lab.Invest.: 11, 455 - 462, 1962
- 77) TREPEL F., RASTETTER J., THEML H. und STOCKHUSEN C.:
Nukleinsäuresynthese und Zytostatikawirkung in
pathologischen Lymphknotenzellen.
Med. Klinik 61, 618 - 622, 1966
- 78) TSIRIMBAS A.D.: Markierung von Lymphdrüsen mit
radioaktivem Thymidin in vivo beim Menschen .
(Im Druck)
- 79) WEGENER K., HOLLWEG S. und MAURER W.: Autoradio-
graphische Bestimmung der Dauer der DNS-Ver-
dopplung und der Generationszeit bei fetalen
Zellen der Ratte.
Nat.wiss.: 50, 738 - 739, 1963
- 80) WILLMANS W.: In: Chemotherapie maligner Tumoren,
Hsgb.: H.Wilmanns, F.K.Schattauer Verlag,
Stuttgart, 180, 1964
- 81) WIMBER D.E.: Methods for Studying Cell Proliferation
with Emphasis on DNA Labels.
In: Cell Proliferation. Eds.: L.F.Lamerton and
R.J.M.Fry, Blackwell Scient.Publ., Oxford,
1 - 17, 1963
- 82) WIMBER D.E. and QUASTLER H.: A ¹⁴C- and ³H-Thymi-
dine Double Labeling Technique in the Study of
Cell Proliferation in Tradescantia Root Tips.
Exp.Cell Res.: 30, 8 - 22, 1963
- 83) YOFFEY J.M. and COURTICE F.C.: Lymph, Lymphatics
and Lymphoid Tissue. Verlag M.Arnold, London, 1956

Lebenslauf

Personalien:

Klaus Wittmann, geb. am 24.12.1943 in Augsburg

Vater: Hans Wittmann, kaufmännischer Angestellter

Mutter: Magdalena Wittmann, geb. Ziegler

Schulbildung:

Wittelsbacher Knabenschule Augsburg, 1949 - 1953

Realgymnasium Augsburg, 1953 - 1962, Abitur 1962

Militär:

Oktober 1962 - September 1964, Luftwaffe, Abgang als
Reserveoffizier

Studium:

Medizinische Fakultät der Universität München, elf
Semester, von November 1964 - Februar 1970, Staats-
examen mit dem Urteil "sehr gut" am 16.6.1970

